N° d'ordre
2657

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

PRESENTÉE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MICHEL GERVAIS

SUJET : PROTEOLYSE MÉNAGÉE : UN OUTIL AU SERVICE D'UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTION AU SEIN DU FLAVOCYTOCHROME B_2 DE LEVURE.

SOUTENUE LE 15 DÉCEMBRE 1982 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MME J. YON-KAHN	PRÉSIDENT
M. G. COHEN	RAPPORTEUR
M. C. GHÉLIS	
M. J. JANIN	
MME F. LABEYRIE	

N° d'ordre
2657

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

PRESENTÉE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MICHEL GERVAIS

SUJET : PROTEOLYSE MÉNAGÉE : UN OUTIL AU SERVICE D'UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTION AU SEIN DU FLAVOCYTOCHROME B_2 DE LEVURE.

SOUTENUE LE 15 DÉCEMBRE 1982 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MME J. YON-KAHN	PRÉSIDENT
M. G. COHEN	RAPPORTEUR
M. C. GHÉLIS	
M. J. JANIN	
MME F. LABEYRIE	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

"Quiconque cherche quelque chose il en vient à ce point : ou qu'il dit qu'il l'a trouvée, ou qu'elle ne se peut trouver ou qu'il en est encore en quête. Toute la philosophie est départie en ces trois genres. Son dessein est de chercher la vérité, la science et la certitude. Les Péripatéticiens, Epicuriens, Stoïciens et autres ont pensé l'avoir trouvée. Ceux ci ont établi les sciences que nous avons et les ont traitées comme notices certaines. Clitomachus, Carnéade et les Académiciens ont désespéré de leur quête et jugé que la vérité ne se pouvait concevoir par nos moyens. La fin de ceux-ci c'est la faiblesse et humaine ignorance (....). Pyrrhon et autres Sceptiques (..) disent qu'ils sont encore en cherche de la vérité. Ceux-ci jugent que ceux qui pensent l'avoir trouvée se trompent infiniment ; et qu'il y a encore de la vanité trop hardie en ce second degré qui assure que les forces humaines ne sont pas capables d'y atteindre. Car cela, d'établir la mesure de notre puissance, de connaître et juger la difficulté des choses, c'est une grande et extrême science, de laquelle ils doutent que l'homme soit capable ".

Michel de MONTAIGNE
ESSAIS
Livre second, chapitre XII

A ce stade ultime de la rédaction de cette thèse il est bien difficile d'établir un ordre d'entrée en scène, l'apport de chacun à l'achèvement de ce travail étant différent mais foncièrement essentiel. N'étant attiré ni par l'ordre alphabétique -direct ou inverse-, ni par l'ordre hiérarchique -direct ou inverse- ou le tirage au sort je me suis dirigé vers le choix d'un désordre quasi total ponctué d'un semblant de chronologie.

Ce travail a été effectué à Gif-sur-Yvette, au Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique que dirige Monsieur le Professeur P. SLONIMSKI dans le laboratoire d'Enzymologie Physico-chimique qu'anime Madame F. LABEYRIE.

Partie visible de l'iceberg, il est en fait avant tout l'aboutissement d'un long chemin. Parmi ceux qui m'aidèrent à le tracer, je tiens à citer mes parents dont le sacrifice continuel dans quelque domaine que ce soit fut le principal soutien de ma persévérance.

Il me semble également juste de rendre hommage au corps enseignant en citant symboliquement Monsieur GREGET, instituteur au cours moyen seconde année à l'école Phalsbourg du Havre, Messieurs REGNIER et LECOUTOUR, professeurs de mathématiques ainsi que Monsieur SERGENT, professeur de lettres au lycée "Porte Océane" du Havre. Parmi d'autres et malgré d'autres ils ont su me rendre savoureux le fait d'apprendre et de découvrir.

Madame Christine MULET-CLAMAGIRAND fut mon compagnon de faculté à Rouen et à Orsay, je la remercie de sa fidélité et de sa constante disponibilité.

Au laboratoire j'ai eu la chance de pouvoir travailler sous la direction de Madame F. LABEYRIE qui, en me donnant la possibilité d'aborder les problèmes avec ma propre approche m'a permis de mieux mesurer la difficulté de la tâche. J'ai apprécié sa confiance, la justesse de ses conseils et de ses critiques tout au long de ces années ainsi que son aide dans l'interprétation de certains résultats. Je la remercie enfin pour l'excellent climat dans lequel ce travail a été effectué ainsi que des facilités matérielles qu'elle m'a apportées.

C'est à Mademoiselle Lylian NASLIN que je dois l'apprentissage des petits et des grands secrets de la manipulation. Qu'elle en soit remerciée. Qu'elle sache également tout le remords que j'ai de découper en morceaux le H-flavocytochrome b_2 qu'elle s'est donnée tant de mal à préparer afin qu'il soit du meilleur cru possible. Je remercie également tout particulièrement Madame Yanick RISLER qui, par sa collaboration efficace contribua largement à la réalisation de l'ensemble de ce travail. J'implore son pardon pour les

expériences hasardeuses dans lesquelles je l'ai parfois entraînée ainsi que pour les tâches peu stimulantes dont je me suis volontiers débarrassé.

Je suis très reconnaissant à Madame M.A. THOMAS de m'avoir permis, en cours de route d'occuper un bon strapontin dans un travail, celui concernant le Zn-cytochrome c qu'elle a eu tout le mérite d'initier et de développer.

Je tiens également à remercier Madame C. CAPEILLERE-BLANDIN qui m'a proposé de collaborer avec elle pour l'étude, en cinétique rapide des dérivés que j'avais préparés ainsi que Mademoiselle F. LEDERER pour les séquences d'acides aminés qu'elle a accepté d'effectuer dans son laboratoire. J'ai particulièrement apprécié à cette occasion la collaboration de Mesdames A. GLATIGNY et A.M. BECAM pour la réalisation de ces séquences ainsi que de Monsieur R. GHRIR pour l'interprétation des résultats des dansylations.

Dans notre laboratoire j'ai également été amené à travailler avec Mesdemoiselles O. VERGNES, M. TEGONI et S. CORAZZIN, étudiantes de DEA. Ce fut toujours avec plaisir.

J'ai largement profité d'autre part du soin et de la compétence de Mademoiselle D. LAPOINTE en particulier pour la réalisation pratique de ce manuscrit. Quelle sache que les remerciements que je lui adresse sont bien plus là encore qu'une simple formule de politesse. Il en est de même pour Madame G. PEUDEVIN pour sa contribution à la préparation du H-flavocytochrome b_2 et pour la remise en ordre des champs de bataille les lendemains de grandes voire même de petites "manips".

Je n'oublie par pour autant mes autres collègues du laboratoire en particulier Madame T. IWATSUBO dont j'ai pu apprécier la gentillesse en maintes occasions, en particulier lorsqu'elle me rapporta du Japon une protéase non encore commercialisée et Monsieur J.-M. JALLON qui s'est souvent intéressé à mon travail avec une constructive et cordiale agressivité.

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement Madame J. YON-KAHN, dont je suis un ancien étudiant, de m'avoir permis d'aller au delà de ce stade et d'avoir accepté la présidence de mon Jury.

Que les autres membres de ce Jury, en particulier Messieurs G. COHEN, C. GHELIS et J. JANIN sachent également quant à eux que je ne sous estime pas leur apport à la bonne réalisation de ce travail.

Il m'est également agréable d'associer à ces remerciements Monsieur J.R. GAREL qui, en maintes occasions, a montré beaucoup de disponibilité à mon égard et Madame O. GROUDINSKY -dont j'ai développé les travaux préliminaires- qui me conseilla et m'encouragea et sut avec efficacité et compétence me décharger de mes responsabilités familiales.

Abbréviations utilisées

H-flavocytochrome b_2 (ou enzyme H) : flavocytochrome b_2 extrait de la levure Hansenula anomala

S-flavocytochrome b_2 (ou enzyme S) : flavocytochrome b_2 extrait de la levure Saccharomyces cerevisiae

FDH_T (nommée T-flavodéshydrogénase dans l'article I) : entitée flavoprotéique clivée en "a" conservant une activité lactate → ferricyanure réductasique, obtenue par trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2

β'_T : fragment obtenu par trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2, autrefois nommé β ou β_T (article I et article III). Voir article II pour la justification de la nouvelle nomenclature.

Autres fragments du flavocytochrome b_2 : voir schéma récapitulatif ci-dessous.

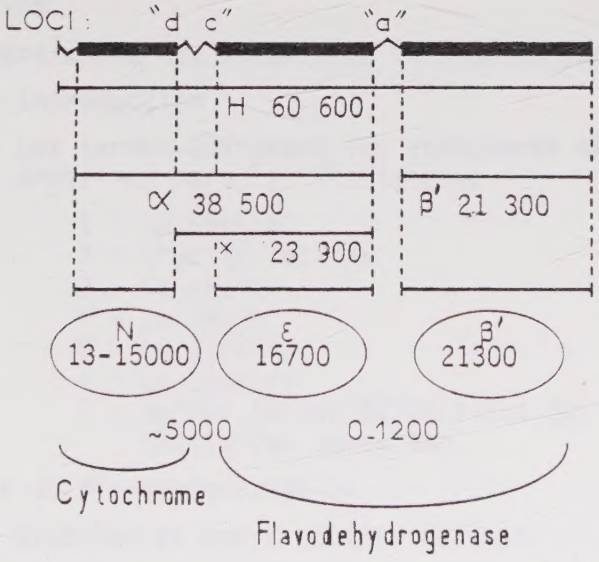

Schéma selon Gervais et al (239) modifié selon les poids moléculaires déterminés dans l'article II.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543523_0016

PLAN DE LA THESE

- Avertissement 7
- Introduction Générale 8
- Objet de la Thèse 11
- Présentation du problème 12
  - I - Localisation des coenzymes et des fonctions 12
  - II - Etude des perturbations fonctionnelles apportées par des modifications structurales du flavocytochrome b_2. 15
  - III - Interactions du flavocytochrome b_2 et du cytochrome c. 16

CHAPITRE I : *LE FLAVOCYTOCHROME b_2 : TROIS GLOBULES, DEUX DOMAINES FONCTIONNELS.* 18

- INTRODUCTION 19
- ARTICLE I : *Dissection of flavocytochrome b_2 -a bifunctional enzyme- into a cytochrome core and a flavoprotein molecule.* 21
- ARTICLE II : *Spontaneous dissociation of a cytochrome core and a biglobular flavoprotein after mild trypsinolysis of the bifunctional Saccharomyces cerevisiae flavocytochrome b_2.* 30
- DISCUSSION 41
  - I - Nomenclature des structures tertiaires des protéines 41
    - A - Introduction 41
    - B - Les termes désignant les structures tertiaires des protéines dans la littérature. 42
      - 1 - La partie
      - 2 - L'unité repliée
      - 3 - La région
      - 4 - Le noyau
      - 5 - Le globule
      - 6 - Le domaine
      - 7 - Autres termes définissant des structures tertiaires compactes.
  - II - Cas du flavocytochrome b_2 50
    - 1 - Globules et ponts polypeptidiques 50
    - 2 - Séparation des domaines fonctionnels. 54
  - III - Cas général de l'action -in vitro- des protéases sur les enzymes multifonctionnels. 56
    - 1 - Cas où seulement une des fonctions est conservée. 57
    - 2 - Cas où la protéolyse permet la séparation de plusieurs fonctions. 57

CHAPITRE II : *LOCALISATION DU SITE FLAVINIQUE DU H-FLAVOCYTOCHROME b_2* 59

- INTRODUCTION 60

- ARTICLE III : *A flavin mononucleotide binding site in Hansenula anomala nicked flavocytochrome b_2, requiring the association of two domains.* 62

- DISCUSSION 77

1 - Mode d'association des fonctions cytochrome et flavodéshydrogénase dans le flavocytochrome b_2. 77

2 - Conformation du site flavinique : 80

A - Flavoprotéines dont la structure tridimentionnelle est connue. . 80

B - Flavoprotéines ayant subi des protéolyses. 83

C - Comparaisons avec le flavocytochrome b_2. 83

CHAPITRE III : *ETUDE DES PROPRIETES CINETIQUES DE DERIVES PROTEOLYTIQUES DU FLAVOCYTOCHROME b_2.* 85

- INTRODUCTION 86

- ARTICLE IV : *How the loss of several residues, at the level of one interglobule junction, modulates the lactate dehydrogenase activity of yeast flavocytochrome b_2 : a study of the nicked enzymes resulting from clostripain and trypsin action.* 88

- ARTICLE V : *Proteolytic cleavage of Hansenula anomala flavocytochrome b_2 into its two functional domains : isolation of a highly active flavodehydrogenase and a cytochrome b_2 core.* 102

- DISCUSSION 121

I - Modifications fonctionnelles consécutives aux coupures protéolytiques 121

1 - Coupure proteolytique de la zone intrafonctionnelle "a" 121

A - Coupure trypsique du H-flavocytochrome b_2 121

B - Modulation de la perte d'activité selon le type de coupure chez le H-flavocytochrome b_2 122
- coupure clostripaïque
- renaturations croisées

C - Comparaison avec le S-flavocytochrome b_2 123

2 - Coupure protéolytique dans la zone "cd". 124

II - Analyse des processus réactionnels modifiés. 125

CHAPITRE IV : *LOCALISATION DU SITE DE FIXATION DU CYTOCHROME C SUR LE H-FLAVOCYTOCHROME b_2* 127

- INTRODUCTION 128

- ARTICLE VI : *Localisation of the main association areas between flavocytochrome b_2 and cytochrome c by fluorescence studies.* 131

- DISCUSSION 136

A - Localisation des aires d'interaction flavocytochrome b_2-cytochrome c. 136

B - Limites de la méthode utilisée. 138

C - Mode d'association du cytochrome c avec d'autres protéines 139

D - Reflexions sur l'interaction flavocytochrome b_2-cytochrome c. 142

1 - Aires du flavocytochrome b_2 142

2 - Aires du cytochrome c. 143

CONCLUSION GENERALE 145

BIBLIOGRAPHIE 146

A V E R T I S S E M E N T

Parce que chaque contribution scientifique, aussi modeste soit elle ne découle en fait obligatoirement que du travail, de la réflexion, des succès, voire des échecs d'illustres ou d'oubliés prédécesseurs il m'a semblé juste, avant de débuter ce mémoire de rendre hommage à ceux qui, au fil des ans ont conquis le domaine de la connaissance. Si aujourd'hui en particulier, le flavocytochrome b_2 demeure un peu moins mystérieux qu'hier c'est avant tout grâce à eux.

A l'heure où pour certains le désir de paraître semble plus important que celui d'être c'est avec humilité et en gardant à l'esprit ce vieux proverbe français : "il est aisé d'ajouter aux choses trouvées" qui signifie "qu'il n'est ni glorieux, ni si difficile de perfectionner les inventions d'autrui" (1) que je tiens à citer, dans leur quasi totalité, les travaux de mes aînés (2-189), ma contribution s'y ajoutant à sa place ni plus, ni moins. Cette liste qui, par commodité, est regroupée en fin de ce mémoire avec les autres références, -en particulier celles concernant les recherches effectuées sur le flavocytochrome b_2 depuis l'initiation de ce travail (190-279)- ne se prétend pas exhaustive. Toute omission néanmoins ne peut être que fortuite.

INTRODUCTION GENERALE

Depuis la théorie cellulaire de Schleiden et Schwann, formulée en 1838, il est communément admis que la cellule est l'unité de coordination des fonctions biologiques qui constituent la vie.

L'image que l'on en donne aujourd'hui est celle d'une machinerie complexe dont les éléments, qui ont chacun des fonctions spécialisées, diffèrent cependant notablement par le niveau de leur organisation. Parmi ces éléments, ceux dont le rôle essentiel est la production d'énergie (plastes, mitochondries), présentent des structures particulièrement élaborées. Dans de tels organites les enzymes sont strictement compartimentés. Certains d'entre eux sont intégrés à des membranes qui leur imposent une orientation privilégiée (280). Au sein de ces membranes peuvent exister des complexes multienzymatiques de topologies définies (281)

Ces particularités ont rendu difficiles l'extraction et la solubilisation -et par voie de conséquence l'étude- de la plupart d'entre eux, et nécessité l'emploi d'artifices pour les solubiliser et les stabiliser. (282).

En dépit de son appartenance à l'un de ces systèmes organisés -la chaîne respiratoire mitochondriale- la L(+)lactate:cytochrome c oxidoreductase de levure (E.C.1.1.2.3) appelée également selon les auteurs et les époques déshydrase lactique, déshydrogénase lactique, cytochrome b_2 ou flavocytochrome b_2, ne présente pas le caractère d'enzyme membranaire que nous venons d'évoquer. Son extraction sous une forme active est donc relativement aisée. Celle-ci d'ailleurs fut réalisée dès 1928 par Bernheim (9). Elle concrétisait une série de travaux menés depuis une quinzaine d'années par différents chercheurs sur le pouvoir catalytique de la levure dans la réaction d'oxydation du L(+)lactate par le bleu de méthylène (2-8). L'acide pyruvique fut identifié comme le produit de cette oxydation (2,7). Meyerhof (3) montra que l'enzyme (ou les enzymes) impliqué(s) dans cette catalyse différait(ent) des déshydrases lactiques des tissus animaux en ce qu'il(s) fonctionnait(ent) sans coenzyme ajouté. L'extraction de ce (ou ces) enzymes répondait moins cependant au désir de définir ces différences qu'à une préoccupation essentielle de l'époque qui était le problème de la spécificité des déshydrases(9) En effet, si les quatre déshydrases alors connues présentaient chacune une haute spécificité pour leur substrat respectif , il n'en demeurait pas moins

nécessaire avant toute généralisation de tels résultats, de poursuivre l'étude systématique d'autres enzymes de cette classe. La déshydrase lactique de levure fut l'un d'entre eux.

La spécificité de cet enzyme étant définie (9), le rôle inhibiteur du pyruvate ou de l'oxalate démontré (9), le système dans lequel il intervient continua néanmoins à susciter l'intérêt de nombreux chercheurs (10-20). Ainsi fut mise en évidence la réaction catalysée de réduction du cytochrome c par le lactate (12). Une contribution décisive à l'étude de l'enzyme lui même fut apportée par Bach, Dixon, Keilin et Zerfas (16-18, 20) qui montrèrent que cette déshydrogénase lactique copurifiait avec un élément cytochromique portant un protohème IX comme groupement prosthétique. Cet élément, partie essentielle du système, fut nommé "cytochrome b_2".

La spécificité de cette déshydrogénase lactique pour la forme L(+) du lactate fut montrée en 1953 (21,25). Dans des études ultérieures, Labeyrie, Slonimski et Naslin (56) montrèrent que cet enzyme dont la formation était induite par l'oxygène (22,23) ou le L(+)lactate (109,118) était la seule L(+)lacticodéshydrogénase de la levure, les deux autres lacticodéshydrogénases, l'une de la levure anaérobie (49,56) ou aérobie (134, 283), l'autre de la levure aérobie (284-286) étant spécifiques de la forme D(-) du lactate (56,68).

Appleby et Morton en 1954 proposèrent, à partir de la levure de boulangerie une méthode d'extraction et de purification de cette L-lacticodéshydrogénase, méthode dont le stade ultime était la cristallisation de l'enzyme (23,52). Aujourd'hui encore cette forme connue sous le nom de "cytochrome b_2 cristallisé" est l'objet de nombreuses études. Le mérite d'Appleby et de Morton ne se limite cependant pas à ce seul apport. A cet égard, la mise en évidence dans le cytochrome b_2 d'un second coenzyme, le flavin mononucléotide (23), en proportions équimoléculaires avec le protohème IX (53) doit être considérée comme un résultat fondamental.

Le flavocytochrome b_2 fut ensuite beaucoup étudié, avec plus ou moins de bonheur. On se trompa en particulier sur sa structure tertiaire et quaternaire, son poids moléculaire, le nombre de ses chaînes, ses coefficients d'extinction molaire, son volume partiel spécifique, le rôle de la partie flavinique, etc. Des réponses satisfaisantes -dont le détail sera éventuellement évoqué en son temps- sont aujourd'hui également apportées à toutes ces questions.

En ce qui concerne le rôle physiologique de cet enzyme, le problème n'est cependant pas entièrement résolu. Lorsque la chaîne respiratoire principale est bloquée par l'antimycine A, il a été montré par Pajot et Claisse (189) que la levure pouvait néanmoins continuer à se développer en présence de L(+)lactate.

Le rendement énergétique dans un tel cas est cependant nettement plus faible qu'en absence d'antimycine. Pour interpréter ces résultats ces auteurs ont postulé que le flavocytochrome b_2 injectait les électrons en provenance du L(+)lactate dans la chaîne respiratoire principale au niveau du cytochrome c. Dans ces conditions le site de phosphorylation situé en aval de ce dernier demeurerait fonctionnel. Il est maintenant de fait admis par une large majorité que le cytochrome c est l'accepteur physiologique du flavocytochrome b_2. La localisation récente du flavocytochrome b_2 mature dans l'espace intermembranaire mitochondrial (27) dans lequel évolue également le cytochrome c est en bon accord avec une telle hypothèse.

Actuellement, de nouvelles données fonctionnelles et structurales enrichissent de façon régulière la connaissance intrinsèque du flavocytochrome b_2. Si, en particulier, la détermination de sa séquence en acides aminés ou de sa structure tridimentionnelle est en cours, c'est parce que le flavocytochrome b_2 est considéré comme un modèle de l'étude du couplage d'une flavodéshydrogénase et d'un cytochrome.

OBJET DE LA THESE

L'objet de cette thèse est de tenter de mieux appréhender le mode d'intégration, au sein d'un enzyme bifonctionnel où elles sont associées, de deux fonctions dépendantes et d'étudier comment des altérations structurales peuvent modifier l'expression de ces fonctions.

Cet exposé comprendra quatre chapitres :

1/ Définition des domaines structuraux dans le flavocytochrome b_2, localisation des coenzymes et des fonctions.

2/ Etude du site de la flavine.

3/ Etude des perturbations fonctionnelles consécutives à des protéolyses limitées.

4/ Détermination des aires d'association entre le flavocytochrome b_2 et le cytochrome c.

L'état des connaissances avant le début de ce travail pour chacun des quatres problèmes évoqués ci-dessus sera établi dans la partie "Présentation du problème" (les deux premiers thèmes étant regroupés pour faciliter la compréhension). Les stratégies particulières concernant les méthodes d'études choisies seront présentées en introduction de chaque chapitre.

PRESENTATION DU PROBLEME

I - Localisation des coenzymes et des fonctions (chapitres I et II)

Lorsque ce travail a été initié, un certain nombre d'informations indépendantes concernant, soit l'activité, soit la structure du flavocytochrome b_2 étaient disponibles.

En découvrant que deux groupements prosthétiques -FMN et hème- faisaient partie intégrante du même enzyme -le flavocytochrome b_2-, Appleby et Morton se posèrent la question du rôle respectif de chacun de ces deux coenzymes dans la catalyse. Dès le premier article (23), ils émirent l'hypothèse que le flavine mononucléotide était le premier accepteur des électrons en provenance du lactate pour expliquer l'impossibilité de réduire l'hème par le lactate lorsque le FMN était absent, impossibilité qui fut confirmée par la suite (53,79). Cette hypothèse aurait pu se trouver vérifiée par l'étude directe d'un dérivé sans hème (déhémoflavocytochrome b_2). Il s'avéra malheureusement que la flavine portée par un dérivé de ce type, qu'ils pensaient avoir préparé, n'était pas -elle non plus- réductible par le L(+)lactate (79). La fluorescence flavinique anormale de ce dérivé, ainsi que son absence de réactivation en présence de protohémine donnèrent cependant à penser que ce matériel avait subi des altérations irréversibles ayant eu pour conséquence la dissociation du coenzyme flavinique (79). L'hypothèse d'Appleby et Morton fut néanmoins reprise par différents auteurs (26,29,51,54,57,78). La part effective prise par le FMN dans la réaction de transfert d'électrons fut démontrée par Baudras qui réussit le premier à préparer un déflavoenzyme réassociable à la flavine et réactivable (à 50 %) (88) et discuta la probabilité pour que ce coenzyme soit le premier accepteur des électrons en provenance du lactate (III). Ce n'est cependant que bien plus tard qu'Iwatsubo, Mével-Ninio et Labeyrie (220) préparèrent un dérivé sans hème portant la flavine fixée (déhémoflavocytochrome b_2) conservant l'activité lactate déshydrogénase et étudièrent les paramètres cinétiques de cette ferricyanure réductase. Blandin et coll., de leur côté, grâce à des études de cinétique rapide explorèrent la séquence des évènements réactionnels lors de l'addition du substrat lactate à l'enzyme oxydé et montrèrent que du point de vue fonctionnel le flavocytochrome b_2 se comportait comme l'association d'une flavodéshydrogénase et de son accepteur spécifique, un cytochrome de type b (193,194).

La question se posait de savoir qu'elles étaient les structures qui permettaient une telle séquence réactionnelle.

Des hypothèse à ce sujet furent émises avant même que l'étude du mécanisme réactionnel ne soit initié. En 1954, déjà, Appleby et Morton pensaient que les deux groupes prosthétiques pouvaient être portés par des régions structuralement distinctes. "En dépit de plusieurs essais", il ne leur fut cependant pas possible de "séparer une flavoprotéine active d'un cytochrome de type b" (23). Plus concrètement, après avoir préparé un cytochrome b_2 dépourvu d'activité, que Morton compara (77) au noyau dérivé du cytochrome c par trypsinolyse, Horio et Coll (78) proposèrent pour le flavocytochrome b_2 une structure en deux moitiés : une moitié déshydrogénase et une "moitié cytochrome". L'isolement par Labeyrie et coll. (107, 122) d'un fragment cytochromique de poids moléculaire 11 000 après protéolyse trypsique du flavocytochrome b_2 suggéra à ces auteurs que ce fragment qu'ils nommèrent "noyau cytochromique b_2" pouvait être soit l'une des chaînes constitutives de l'enzyme, soit un fragment de chaîne. Une analyse ultérieure montra qu'en réalité l'enzyme dit "cristallisé" préparé selon la méthode d'Appleby et Morton (23,52) était constitué de deux chaînes α et β par protomère de poids moléculaires respectifs 33-36 000 et 19-21 000 (161) et que par conséquent la formation du noyau cytochromique résultait bien d'un processus protéolytique. Des déterminations de séquence en acides aminés permirent de localiser ce noyau cytochromique à l'extrémité N-terminale du fragment α (199).

L'étude d'un flavocytochrome b_2,extrait d'une autre levure (Hansenula anomala) constitué d'une seule chaîne polypeptidique de poids moléculaire $\sim$ 60 000 suggéra à Labeyrie et Baudras (169) que la structure en deux chaînes du flavocytochrome b_2 de S.cerevisiae pouvait résulter d'un artéfact de préparation. Ceci fut confirmé par Jacq et Lederer (168) qui préparèrent en présence d'inhibiteur de protéases une forme non protéolysée de ce dernier qu'ils assimilèrent à la forme dite "physiologique" caractérisée antérieurement par Somlo et Slonimski (126). Plusieurs auteurs interprétèrent la protéolyse artéfactuelle du flavocytochrome b_2 de S.cerevisiae au cours de sa purification, en termes de structure tertiaire. Labeyrie et Baudras (169) proposèrent le terme de "globule" pour caractériser les deux fragments α et β résultant de cette protéolyse limitée. Cette dénomination fut largement adoptée par la suite. Le flavocytochrome b_2 fut qualifié "d'enzyme à deux têtes" (187), l'une de ces têtes, le fragment α , étant la tête cytochromique (161, 171), β quant à lui étant proposé représenter la tête flavinique (171). Cette dernière

proposition, purement spéculative, ne reposait en fait sur aucune évidence expérimentale directe. Deux points en particulier n'avaient pas été abordés :

a) Une étude systématique de la sensibilité protéolytique du flavocytochrome b_2 n'avait pas été faite. Une telle étude aurait été susceptible de remettre en cause la notion de biglobularité en montrant qu' une ou plusieurs zones hypersensibles à l'action des protéases autres que celle située entre α et β pouraient être coupées ou bien que la coupure entre α et β n'était pas consécutive à une structure tertiaire particulière mais simplement à une spécificité très étroite de la protéase impliquée, aussi sélective que celle présentée par exemple par la thrombine (287).

b) Les fragments α et β résultant de la coupure dans la zone "a" n'avaient pas été séparés ni à fortiori étudiés.

Des travaux susceptibles d'apporter des éléments de réponse à ces problèmes avaient été entrepris dans ce laboratoire avant le début de ce travail.

En ce qui concerne le premier point -l'existence d'autres zones de coupure de la chaîne du flavocytochrome b_2, une étude analytique comparée faite sur l'enzyme S et l'enzyme H par Naslin, Spyridakis et Labeyrie (179) avait montré qu'α lui-même était susceptible de subir une coupure trypsique dans une région "cd", coupure donnant naissance à deux nouveaux fragments ε et n dont la stabilité n'avait pas été étudiée. Eu égard au poids moléculaire déterminé pour ce dernier, il fut identifié au noyau cytochromique b_2 que nous avons déjà évoqué plus haut.

La mise en évidence par Labeyrie et Baudras (169) dans certaines préparations, d'un contaminant de poids moléculaire 50 000, qui fut identifié comme une produit de dégradation (nommé P_1)(179) du flavocytochrome b_2, suggérait également la présence, sur la chaîne native, d'une zone sensible à l'action des protéases autre que la zone "a" localisée entre α et β . En ce qui concerne la nature de ce fragment l'hypothèse en vigueur était qu'il s'agissait d'une hémoprotéine (179).

En ce qui concerne le second point -celui de la séparation et de l'étude directe des fragments α et β la meilleure hypothèse résultant des travaux de Mével-Ninio, Risler et Labeyrie (221) non encore publiés à cette époque mais qui m'avaient été communiqués par leurs auteurs, était que les deux fragments α et β du S-flavocytochrome b_2 dit "cristallisé" étaient nécessaires à la réalisation d'une conformation correcte du site flavinique, ce qui était en contradiction avec l'hypothèse la plus couramment admise auparavant.

Un espoir supplémentaire concernant la localisation du site flavinique résidait dans la possibilité, qui avait été montrée par Groudinsky (communication personnelle) d'obtenir, dans certaines conditions de protéolyse ménagée, un dérivé flavoprotéique du flavocytochrome b_2.

Dans les deux premiers chapitres de cette thèse, j'évoquerai donc le développement des travaux concernant la structure polyglobulaire du flavocytochrome b_2, et les relations entre cette structure et les sites de fixation des deux groupements prosthétiques.

II - Etudes des perturbations fonctionnelles apportées par des modifications structurales du flavocytochrome b_2

Dans les paragraphes précédents, j'ai présenté la situation du problème -structure activité- dans le flavocytochrome b_2 selon un point de vue que je qualifierai de "géographique" et qui correspondait à l'un de mes pôles d'intérêt.

Un second pôle était l'étude des relations entre les modifications structurales et leurs conséquences fonctionnelles. Ce thème comme le précédent avait inspiré de nombreux chercheurs et l'effet de diverses modifications de type structural sur l'activité ferricyanure ou cytochrome c réductasique du flavocytochrome b_2 avait été étudié. Au nombre de ces études figurent celles tendant à démontrer le rôle respectif de chacun des groupements prosthétiques dans la réaction catalytique globale. A cet effet l'obtention et l'étude de dérivés sans flavine ou sans hème a été particulièrement fructueuse, ainsi que nous l'avons évoqué précédemment (23,53,79,88,122,220).

D'autres études concernèrent plus particulièrement les perturbations fonctionnelles apportées par des modifications de la structure quaternaire (172), le blocage des groupements sulfydryls (23,29,69,133,140) etc.

Je n'évoquerai ici plus en détail que les travaux ayant trait à l'étude de molécules perturbées dans leur structure covalente, c'est à dire en un mot protéolysées.

Les différences de propriétés catalytiques (modification du K_m pour le L(+)lactate et le cytochrome c, de la vitesse maximum de la réaction, du Ki pour le L(+)lactate en excès) entre les deux formes moléculaires du S-flavocytochrome b_2 dites "physiologique" et "cristallisée" avaient été décélées par Somlo et Slonimski (126) avant même que ne soit démontré que la forme

cristallisée résultait d'une protéolyse ménagée de la forme physiologique par les protéases de la levure (168,169). Après cette découverte les travaux de Somlo et Slonimski furent repris et confirmés (168). L'étude comparée de Naslin, Spyridakis et Labeyrie (179) concernant la trypsinolyse des S et H-flavocytochrome b_2 indiquait que la protéolyse ménagée de chacun de ces deux enzymes pouvait être corellée à une importante perte d'activité. Dans le cas de l'enzyme S, l'activité de la forme "cristallisée" étant prise comme référence, la perte observée atteignait près de 90 % avant même que tout α ne se soit dégradé en noyau cytochromique. Pour l'enzyme H, la situation était plus dramatique encore puisqu'une perte de même ordre -l'activité de l'enzyme natif servant de référence- semblait corellée à la simple coupure de la chaîne en deux fragments de type α et β (179).

Je me suis attaché, ainsi qu'il sera développé dans le chapitre III à étudier plus particulièrement les perturbations fonctionnelles consécutives à l'action de la trypsine (sur le S- et le H-flavocytochrome b_2), de la clostripaïne ainsi que de la protéase de S.aureus V_8 (sur le H-flavocytochrome b_2) et à les comparer.

III - Interactions du flavocytochrome b_2 et du cytochrome c

Bien que dès 1936, Green et Brosteaux (13), travaillant sur des extraits bruts de levure aient soupçonné que la "déhydrase lactique" aujourd'hui nommée flavocytochrome b_2 était capable de réduire le cytochrome c, ce n'est qu'en 1946 que Bach, Dixon et Zerfas (20), contredisant leur première hypothèse (16), observèrent une réduction notable du cytochrome c par le flavocytochrome b_2. La même observation fut faite par Appleby et Morton pour le flavocytochrome b_2 qu'ils avaient purifié et cristallisé (23). Dès lors, le problème de l'interaction de ces deux cytochromes a suscité, comme les deux thèmes précédemment évoqués, de nombreux travaux visant principalement à définir les différents paramètres cinétiques de la réaction (Boéri et al.(25), Appleby et Morton (53), Nygaard (67), Hasegawa et Ogura (76), Morton et Armstrong (80), Morton et al (81). Somlo (94), Hinkson et Mahler (99,100), Somlo et Slonimski (126), Iwatsbuo et al (138), etc.) ,les conditions de formation d'un complexe entre eux, la stabilité et la stoechiométrie de ce complexe (Baudras (154 ,157 ,166), Jacq (192)) l'effet protecteur du cytochrome c vis à vis de la protéolyse du flavocytochrome b_2 (Naslin et coll. (179)) ou de son inactivation (Baudras, (172))etc, la plupart de ces travaux étant effectuée à partir des formes physiologique ou cristallisée de l'enzyme S sur lesquelles l'effort majeur s'était d'abord porté.

L'un des problèmes les plus discutés était de savoir si le processus catalytique de réduction du cytochrome c nécessitait la présence simultanée des deux coenzymes du flavocytochrome b_2 ou si les électrons pouvaient directement être transférés au cytochrome c par le coenzyme flavinique. Les travaux de Forestier et Baudras (157) ainsi que ceux de Iwatsubo, Mével-Ninio et Labeyrie (220) montrèrent que l'activité cytochrome c réductasique du flavocytochrome b_2 ne s'exprimait que si l'hème b_2 était présent. L'un des aspects corollaire de ce problème était de déterminer quelles structures protéiques étaient nécessaires (ou suffisantes) à l'expression de cette activité. C'est à ce second aspect que je me suis plus particulièrement attaché. Les données expérimentales relatives à ce sujet, à ma connaissance, étaient inexistantes lorsque ce travail a été initié.

C H A P I T R E I

LE FLAVOCYTOCHROME B_2 : TROIS GLOBULES, DEUX DOMAINES FONCTIONNELS

ARTICLE I : DISSECTION OF FLAVOCYTOCHROME B_2 - A BIFUNCTIONAL ENZYME - INTO A CYTOCHROME CORE AND A FLAVOPROTEIN MOLECULE.

GERVAIS, M., GROUDINSKY, O., RISLER, Y. & LABEYRIE, F. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 1543-1551.

ARTICLE II : SPONTANEOUS DISSOCIATION OF A CYTOCHROME CORE AND A BIGLOBULAR FLAVOPROTEIN AFTER MILD TRYPSINOLYSIS OF THE BIFUNCTIONAL SACCHAROMYCES CEREVISIAE FLAVOCYTOCHROME B_2.

GERVAIS. M. & TEGONI, M. (1980)
Eur. J. Biochem. 111, 357-367.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le terme de protéases recouvre toute une classe d'enzymes universellement répandus dont la fonction commune est l'hydrolyse des liaisons peptidiques.

Leur intervention, synergique ou isolée est requise dans un grand nombre de processus biologiques essentiels. Elles participent ainsi au renouvellement des protéines, dont le temps de demie vie peut être très court (288-289) en libérant des acides aminés qui vont former les réserves communes de la cellule et servir éventuellement à de nouvelles synthèses protéiques. Au delà de ce rôle quelque peu spectaculaire, certaines protéases peuvent avoir dans des systèmes bien définis des actions beaucoup plus discrètes mais tout aussi déterminantes (voir par exemple la revue de Keil (290)). Ces systèmes sont ceux de la production d'hormones, de la métastase, de la coagulation du sang de la traversée des membranes par les protéines au moment de leur synthèse, de l'activation des zymogènes etc. (291-295). Dans ces sytèmes, la protéolyse est généralement limitée et hautement spécifique. Cette spécificité est dirigée vers un type de liaison peptidique donné. On admet même (bien que la preuve formelle en soit plus difficile à établir) que certaines protéases telles celles impliquées dans la coagulation du sang sont spécifiques d'une séquence protéique donnée présente sur une seule protéine.

En dehors de ce rôle essentiel des protéases in vivo et en raison de la spécificité étroite d'une partie d'entre elles (290) on conçoit aisément qu'elles soient devenues pour le biochimiste un des outils fondamentaux de l'étude -in vitro- de la structure des protéines.

Lorsque, dans les années 1965, dans ce laboratoire, la trypsine fut utilisée par F. Labeyrie et al (122) en tant qu'outil protéolytique pour étudier la structure du S-flavocytochrome b_2, cet usage était encore peu répandu, ainsi qu'en témoigne une revue datant de cette époque (297). Les protéases sont aujourd'hui par contre largement utilisées pour tenter d'obtenir des fragments destinés à être séquencés, d'isoler des régions globulaires ou de séparer des domaines fonctionnels.

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'effet de la trypsine (utilisée toujours comme outil) sur le H-flavocytochrome b_2 (article I) et le S-flavocytochrome b_2 (article II). Les renseignements apportés par cette étude concernent deux points principaux :

- la structure tertiaire du flavocytochrome b_2
- la partition de l'enzyme bifonctionnel en deux entités fonctionnelles distinctes

Ce travail continue et développe l'analyse faite par Naslin, Spyridakis et Labeyrie. Il a bénéficié d'autre part à son initiation d'expériences préliminaires faites par O. Groudinsky dans ce laboratoire montrant qu'un polypeptide portant le FMN fixé et dépourvu d'hème pouvait se former de façon transitoire lors de la trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2.

Dans la discussion seront évoqués les problèmes de nomenclature des éléments de la structure tertiaire des protéines. Le rappel d'exemples connus de la littérature permettra d'autre part de mieux situer ce travail dans le contexte général de l'action, in vitro, des enzymes protéolytiques sur les protéines multifonctionnelles.

Vol. 77, No. 4, 1977 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

DISSECTION OF FLAVOCYTOCHROME b_2 - A BIFUNCTIONAL ENZYME - INTO A CYTOCHROME CORE AND A FLAVOPROTEIN MOLECULE

M. GERVAIS, O. GROUDINSKY, Y. RISLER and F. LABEYRIE

Centre de Génétique Moléculaire du CNRS - 91190 Gif-sur-Yvette, France

Received July 18,1977

SUMMARY : After a cleavage of the two trypsin-sensitive zones characterized along the folded polypeptide chain of the *Hansenula anomala* flavocytochrome b_2 (yielding three fragments N, ε and β), the tetramer molecule (MW 4 x 60 000) divides into two kinds of stable molecules showing no affinity for each other. One is the cytochrome b_2 core (MW ca 14 000) which is very similar to its bakers'yeast homologue and which corresponds to fragment N. The other molecule is a T-flavoprotein which up to recently escaped detection and which is characterized in the present paper. It is a tetramer of MW ca 160 000, each protomer being made of one ε (MW 18 300) and one β (MW 21 600) fragment and of the flavin binding sites.

The manner in which the flavin and the heme are integrated within flavocytochrome b_2 (a complex tetramer molecule with a L-lactate cytochrome c reductase activity (EC 1.1.2.3) detected only in yeasts) has been the subject of many speculations and experimentations. The idea of a complex between a flavoprotein and a cytochrome used to be preferentially considered but was not supported by further data showing that the protomer was formed of a single chain of MW ca 60 000 (1, 2).

Under controlled conditions, certain proteases are able to selectively cleave each chain of the tetramer within two zones, at markedly different rates. These cleavages have been studied in detail with two different flavocytochrome b_2, one prepared from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (symbol S) and one from the yeast *Hansenula anomala* (symbol H). The fastest cleavage (Fig. 1) occurs at a same locus termed "a" on both S and H flavocytochrome b_2 (Naslin et al (3)). It yields, with very little loss of peptide material, two fragments α and β. These two fragments were considered for a while (4, 5) to be actually the two kinds of chain associated within the protomers of the native molecule. On the H enzyme, this site "a" is cleaved by trypsin (other proteases have not been tried) (3). On the S enzyme, it is cleaved by yeast proteases (2) in the course of the preparation by the Appleby-Morton procedure (6) and by chymotrypsin (7). Whatever the flavocytochrome and the protease used, the α and β fragments remain firmly associated in the proteolyzed enzymes and can be separated only at high guanidine-HCl concentration (8-10). Attempts were made to assign the heme and flavin binding sites to each of the two fragments : it was shown that α carries the heme binding site (4, 8, 9)

Copyright © 1977 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

ISSN 0006-291X

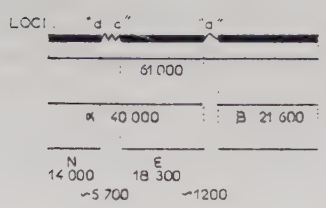

Fig. 1 : Scheme of the trypsin-sensitive zones along the flavocytochrome b_2 chain.
The position of loci a, c and d were deduced from the molecular weight of the fragments ε, N, β, and their evolution during trypsinolysis (3) taking into account the N terminal position of the cytochrome b_2 core (11).

but that the flavin site belongs neither to α nor to β, even with a three order of magnitude lower stability constant, but only to the native or reconstituted αβ assembly (8).

The second trypsin-sensitive zone was observed both on the S and on the H-flavocytochrome b_2 (3, 9, 10) ; it is located within the α part of the chain (Fig. 1). Its cleavage, which is much slower than that at locus "a", yields two new fragments :ε (MW 18 300) and N (MW 14 000) with a loss of ca 50 residues which, most probably, mainly come from a polypeptide bridge joining ε to N and termed "cd". The stability to trypsin of the 3 fragments produced supports a triglobular folding model for the native flavocytochrome b_2 monomer (10).

When such a H-flavocytochrome b_2 hydrolysate is fractionated by molecular sieving in a neutral phosphate or tris-HCl buffer, a fast moving yellow component is resolved from a slower red one. These two components - a T-flavoprotein and a cytochrome core, which were covalently associated in the intact flavocytochrome - were characterized as described below.

METHODS

The H-flavocytochrome b_2 was extracted from lyophilized *Hansenula anomala* yeast grown in the Laboratoire de Fermentation du CNRS and purified by the procedure described in ref. 12. Samples of the ammonium sulfate precipitate, collected by centrifugation, were dissolved in a 50 mM pyrophosphate, 200 mM lactate, 1 mM EDTA, pH 8 buffer and equilibrated against the same buffer by filtration on a small Sephadex G 25 column. Concentrations were ca 120 µM. Hydrolysates : Trypsin was added to the flavocytochrome b_2 solution at final concentrations of 40 µM. The mixture was incubated at 20°. Two kinds of differently behaving hydrolysates, could be distinguished (a) those corresponding to a relatively short incubation, 7 hours, yielding 80 % (mole/mole) of the initial FMN in the flavoprotein fraction after G 200 Sephadex or LKB Ultrogel AcA 34 filtration (see legend Fig. 2) ; and (b).those corresponding to longer proteolysis at 20°, followed or not by a prolonged incubation at 0° (up to a month). They yield as little as 7% of FMN in the flavoprotein fraction. Whatever the incubation time, the yield of heme in the cytochrome fraction is

nearly 100 %. In certain preparations, the hydrolysate was precipitated by ammonium sulfate at 80 % saturation ; after centrifugation part of the cytochrome core remained in the supernatant and the dissolved precipitate was used for the molecular sieving.
Molecular sieving : A typical procedure is described in the legend of Fig. 2. Absorbance and fluorescence characterization were carried out respectively on a Cary 15 and on a spectrophotofluorometer built by Dr. Iwatsubo (13), as described in (14). Standardizations with riboflavin and with tryptophan allow the determinations of flavin (15) and of protein tryptophan contents (16). The following $\varepsilon(mM^{-1}cm^{-1})$ values were taken for concentration calculations : 120 at 412-413 nm (γ_{max}) and 17.2 at 450 nm for the oxidized bound heme and 181 at 423 nm for the reduced form, 130 at 413 nm and 183 at 423 nm for respectively oxidized and reduced flavocytochrome b_2 (17, 14), 11 at 450 nm and 10.2 at 412 nm for oxidized bound flavin (14), 12.5 at 445 nm for free flavin. In oxidized samples where both flavin and heme were present, their respective amounts were calculated by the classical two-wavelength procedure using absorbances at 450 nm and 412 nm (formula given in ref (18)).

RESULTS

When the trypsin hydrolysates of H-flavocytochrome b_2 are analysed at different times on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS, each of the three species N, ε, β, formed after a two-zone trypsin cleavage of H-flavocytochrome b_2 under the conditions described in the methods section, reaches its maximal concentration after 100 min and remains stable for at least 7 hours (9, 10). With much longer proteolysis, ε and N also remain stable, but there is a slow destruction of β. Molecular sieving of a "short" hydrolysate (7 hours) (see Methods) leads to the elution profile presented in Fig. 2. A similar profile but with a lower flavoprotein yield is obtained with "long" proteolysis.

The absorption and fluorescence spectra of the yellow form component, typical of a T-flavoprotein solution, are presented in Fig. 3 ; they correspond to fresh samples resulting from a long proteolysis, just eluted from the molecular sieving column and in which the amount of free flavin is less than 10 % of total flavin. This fact is supported by two kinds of results : (a) Indeed the specific flavin fluorescence of such a sample at a concentration ca 10 µM, is 10 % that of an aliquote diluted in 6 M urea (where all the flavin is dissociated), this residual fluorescence is probably mainly due not to the bound flavin itself but to dissociated flavin. (b) L-lactate which is not able to promote the reduction of free flavin in the presence of active flavocytochrome b_2, reduces the T-flavoprotein samples with a $\Delta A/A$ reaching about 90 % that produced by dithionite. Spectra of such samples exhibit absorption maxima at 368 nm and 450 nm for the oxidized form. The spectra of the T-flavoprotein fractions differ largely in "short" and "long" proteolyses. In the former, there is residual heme bound to α fragments which, due to its absorbancy coefficient 10 fold higher than that of flavin, gives a more or less important peak at 412 nm when oxidized, or 423 nm when reduced. Aging of the T-flavopro-

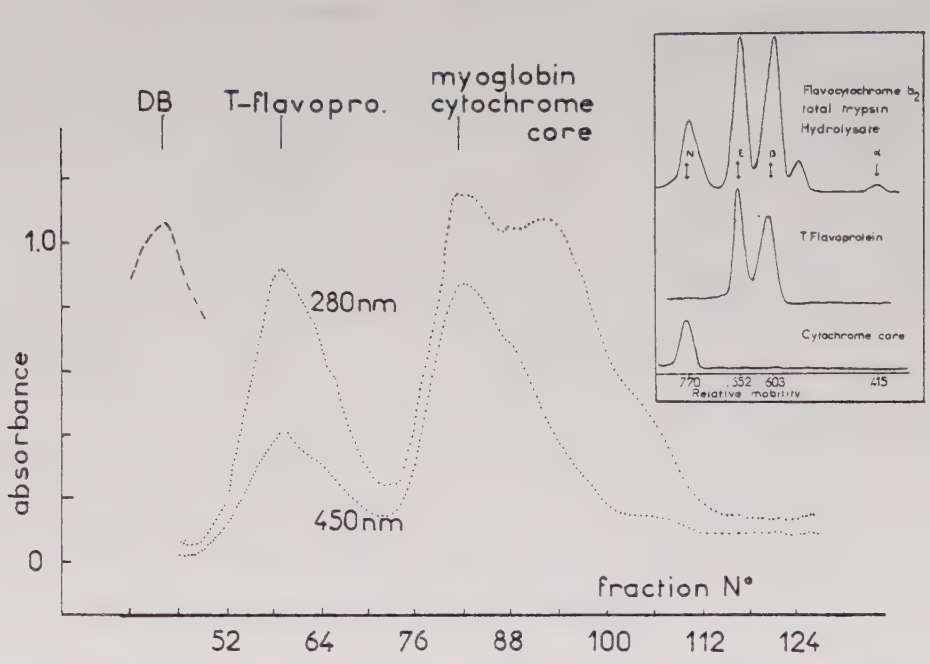

Fig. 2 : Separation of the T-flavoprotein and the cytochrome core by molecular sieving of a trypsin hydrolysate of H-flavocytochrome b_2 : their subunits composition.
The sample corresponding to 7 hours proteolysis under conditions (a) (cf. Methods) was deposited on a column (h = 40 cm, Ø = 2.5 cm) filled with LKB ultrogel AcA 34, equilibrated with 0.15 M phosphate 0.25 mM EDTA buffer pH 7 eluted with the same buffer ; elution profile of the yellow first peak and red second peak. Each fraction was of 2.062 ml. Dextran blue (DB) and myoglobin were used for MW calibrations. *Insert* : densitometric patterns (after polyacrylamide (10 %) gel electrophoresis in the presence of SDS and amidoblack staining under the standard conditions described in (3)) for the three samples mentioned. Mobility of bromophenol blue is taken as 1.

tein solutions results in increase of the (fluorescence in buffer)/(fluorescence in urea) ratio ie increase of free flavin. From dilution experiments the dissociation constant of FMN was estimated to ca 1 µM (order of magnitude).

The fact that L-lactate is able to nearly entirely reduce the flavoprotein supports several conclusions ; firstly the L-lactate binding site is still present on this derivative, secondly the redox potential of the bound flavin is much higher than that of free flavin (similar to that of the lactate pyruvate system ca -190 mv) as is the case for the flavocytochrome b_2 ($E_{m,7} \sim -52$ mv (n = 2)(19)). Preliminary stopped-flow assays, with the same kind of samples containing very little free flavin, indicated a monophasic first-order time course with a rate constant of 3.5 s^{-1} at 10° (150 mM L-lactate) ie a reaction rate of 7 elect.equiv. x s^{-1} x $(FMN)^{-1}$. The molecular activity observed

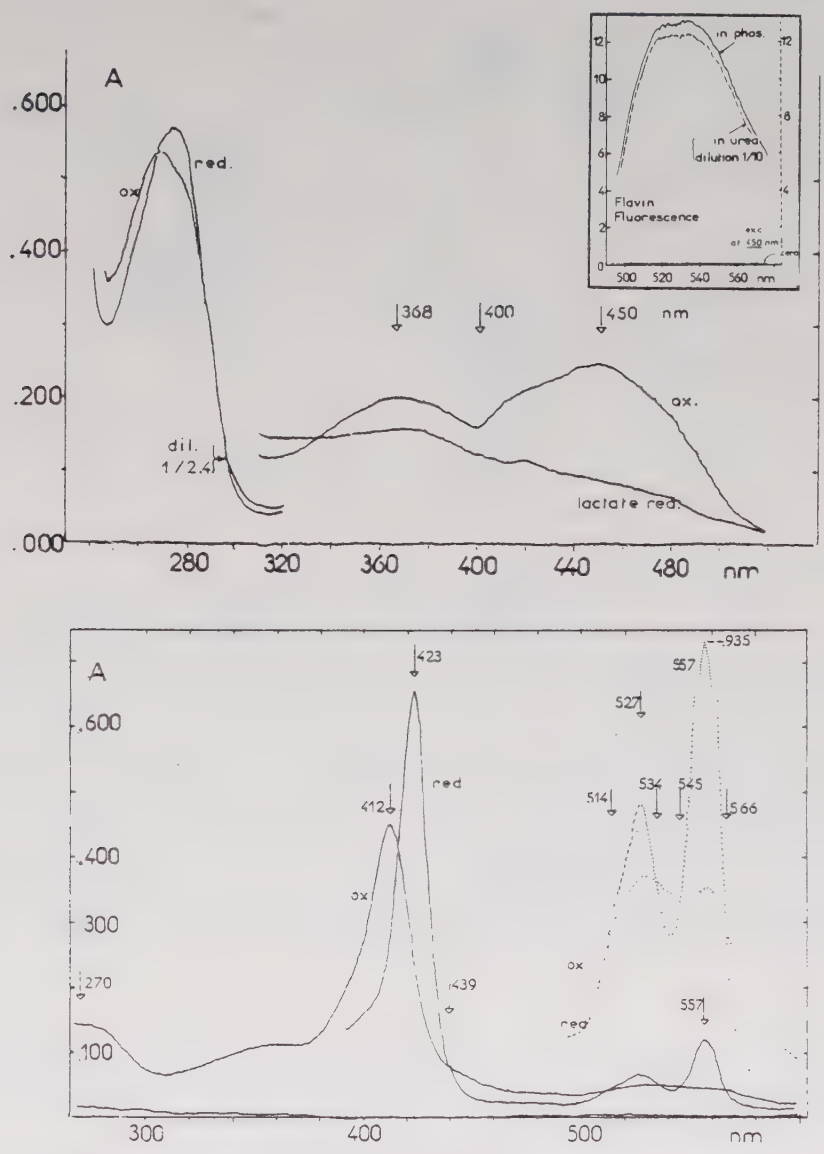

Fig. 3 : Absorption spectra of the T-flavoprotein and of the cytochrome b_2 core
Top : T-flavoprotein : spectra of a sample of "long proteolysis" studied just after elution (cf. Fig. 2) under its oxidized and lactate reduced forms. Addition of dithionite decreased just a little the lactate reduced spectrum (∿ 10 %) at 439 nm. *Insert* : a sample ca 12 µM resulting from a "short proteolysis" ((heme)/(FMN) = 20 %) also studied just after elution, has its flavin fluorescence excited at 450 nm. Solid line : without dilution ie in 0.15 M phosphate buffer pH 7. Dashed line : dilution 1/10 in 6 M urea in the same buffer. Baselines with the two solvant buffers, undistinguishable, were recorded at the same scale. Fluorescence intensities are given in arbitrary units and not corrected for wavelength dependences of the photomultiplier sensitivity and xenon source emission.
Bottom: Cytochrome core : spectra of an oxidized and dithionite reduced sample. Dotted lines : αβ region at a 9-fold higher concentration. The purest sample studied exhibited a A_{412}/A_{270} ratio of ca 5.

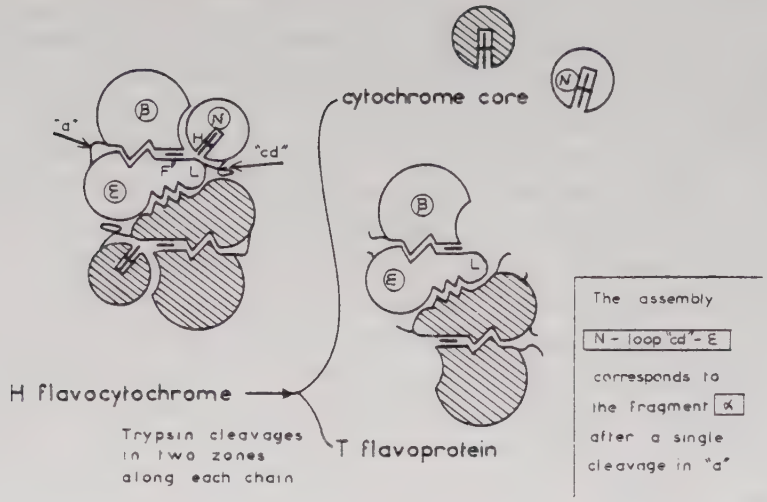

Fig. 4 : Model of the triglobular flavocytochrome b_2 and its trypsin dissociation into cytochrome core and T-flavoprotein.
Half of a flavocytochrome b_2 molecule is drawn here as an assembly of two triglobular protomers (as established by Gervais et al (10)). Loops "a" and "cd" are the zones sensitive to trypsin. Heme (H) is attached to the globule N ie the cytochrome core. Flavin (F) is supposed to be inserted between ε and β (see text). Lactate binding site (active center) is also present on the flavoprotein. It is assumed to be located close to flavin and to involve a SH group located on ε (since this essential group was characterized previously on α (20)). Note that a single cleavage in "a" leaves the whole tetramer assembly intact, the two fragments of each protomer, α on the one hand (corresponding to the "εN" covalent assembly) and β on the other hand remaining strongly bound. This interprotomer binding interaction is still present within the T-flavoprotein and is assumed to involve ε-ε hydrophobic interactions. After the two-zone cleavage, the core (N) and the T-flavoprotein domains dissociate spontaneously in neutral buffer.

in the presence of L-lactate and ferricyanide as extrapolated to $(L\text{-lactate})_\infty$ at 15°, is 8 elect.equiv. $\times s^{-1} \times (FMN)^{-1}$. The rough agreement between steady state and flavoprotein reduction rates indicate that the catalytic process is limited by this reduction step.

The subunit composition of the T-flavoprotein and of the T-cytochrome b_2 core were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS and compared to the non-fractionated hydrolysates (Fig. 2). The flavoprotein retains the ε and β subunits while the T-cytochrome b_2 core retains only the N subunit. Comparing the area under peaks ε and β (on the densitometric patterns of the gels stained under standard conditions) for the T-flavoprotein and for the non-fractionated hydrolysates, one can see that the ratio S_ε/S_β is approximately the same in both cases. The hydrolysates taken into consideration are those in which one molecule of the H chain yielded one mol-

ecule of each of the three fragments which were not degraded after their production. It is thus clear that the reaction can be described by the model presented in Fig. 4, showing how one triglobular protomer of flavocytochrome yields, after cleavages in both zone "a" and "cd", one protomer of the cytochrome b_2 core (globule N) and one biglobular protomer ($\varepsilon\beta$) of the T-flavoprotein. This scheme is also supported by the distribution of tryptophan among the two resolved proteins. Among the 6 tryptophans per heme detected in the H-flavocytochrome b_2 protomer, two per heme are present in the T-cytochrome b_2 core and 3-4 per FMN are found in the T-flavoprotein preparations.

The molecular weights of 18 300 for ε and 21 600 for β (10), lead to a MW of 40 000 for the T-flavoprotein monomer. Comparison of the elution volume from several molecular sieving experiments of the T-flavoprotein with those of flavocytochrome b_2 and of myoglobin or cytochrome c (Fig. 2) leads to an estimation of 160 000 daltons for the T-flavoprotein molecule resulting from short hydrolysis ; this suggests a tetramer $(\varepsilon\beta)_4$ association. An equilibrium sedimentation study of a similar sample containing 15 % residual α chains (ρ/ρ_o = 1.019, $\bar{v}$ = 0.744, 4°, linear pattern for the plot *$ln c$ as a function of r^2*) also gave a value of MW 163 000. The elution volume of the cytochrome b_2 core, because of its very similarity to that of myoglobin, indicates that this core remains in a monomer state. However, with long hydrolysis in which, as stated above, β is slowly destroyed (10) three correlated phenomena were revealed *i/* there is an excess of ε over β in the T-flavoprotein, *ii/* the bound flavin recovery is low and *iii/* the T-flavoprotein polymerizes resulting in high molecular species as judged by its exclusion from G 200 Sephadex and its turbidity.

DISCUSSION

The results reported here lead to a model of flavocytochrome b_2 (Fig. 4) in which each chain folds in two domains, one, monoglobular, starting from the N terminal (11) and forming the cytochrome domain and one, biglobular, forming a flavodehydrogenase domain. The latter retains the interprotomer binding capacity, while the former does not seem to do so. Moreover, the two domains dissociate spontaneously when the "cd" bridge linking them is destroyed by trypsin.

In spite of the fact that T-flavoprotein is reducible by lactate and has intrinsically a lactate ferricyanide reductase activity, it must be emphasized that its enzymatic features are very different from those of its parent, the initial H-flavocytochrome b_2. This will be discussed in a future paper reporting the analyses of the repercussions, in terms of kinetic parameters, of the various cleavages accompanied or not by loss of some peptide fragments.

In the light of well characterized systems presenting a biglobular structure (21,22), Labeyrie and Baudras (1) suggested that the unique chain of

flavocytochrome b_2 could result from a gene fusion between those coding for a cytochrome and a flavoprotein ancestor. The bridge between the two domains, ie the fusion trace, was then thought to be at locus "a". The present work in particular the discovery of a flavoprotein domain still stable after its tryptic separation from the cytochrome domain, shows that such a fusion trace is not at locus "a" but at the level of the "cd" loop. This fusion enabled the linking of two proteins which where functionally dependent but which might have no tendency to form stable complexes : indeed, as discussed by Iwatsubo et al (14), within the intact flavocytochrome b_2 molecule the cytochrome b_2 prosthetic group behaves as the specific acceptor of the L-lactate flavodehydrogenase part of the molecule.

This covalently associated flavoreductase-cytochrome system present in yeast mitochondria should be compared with the system present in liver microsomes, where the flavoreductase and the cytochrome b_5 are separate molecules both tightly anchored in the membrane. The finding by Guiard et al (23) of large sequential homologies (which fit with a common folding pattern) between the polypeptide chains of the cytochrome b_2 and b_5 cores supports the conclusion that both proteins derive from a common ancestral cytochrome b. If we now try to compare the flavoreductase part of the two systems, the only homologous portion could be (considering the one domain - one specific binding site hypothesis of Rossman et al (24)), the isoalloxazine ribosyl binding site. In flavodoxin that domain involves about 60 residues forming two loops, each joining a β sheet and a α helix forming polypeptide segment (25). Such a structure could be shared between two globular domain for exemple ε and β.

The present work was presented as a poster and summary at the 10th FEBS Meeting, Paris, 1975.

REFERENCES

1 - Labeyrie, F., and Baudras, A. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 33-40.
2 - Jacq, C., and Lederer, F. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 41-48.
3 - Naslin, L., Spyridakis, A., and Labeyrie, F. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 268-283.
4 - Lederer, F., and Simon, A.M. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 469-474.
5 - Mével-Ninio, M. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 254-261.
6 - Appleby, C.A., and Morton, R.K. (1959) Biochem. J. 71, 492-499.
7 - Pompon, D., and Lederer, F. (1976) Eur. J. Biochem. 68, 415-423.
8 - Mével-Ninio, M., Risler, Y., and Labeyrie, F. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 131-140.
9 - Gervais, M. (1976) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paris-Sud.
10 - Gervais, M., Risler, Y., and Labeyrie, F. (in preparation).
11 - Guiard, B., Lederer, F., and Jacq, C. (1975) Nature, 255, 422-423.
12 - Labeyrie, F., Baudras, A., and Lederer, F. (1977) in Methods in Enzymology (in press).

13 - Iwatsubo, M., and di Franco, A. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol.47, 891-910.
14 - Iwatsubo, M., Mével-Ninio, M., and Labeyrie, F. (1977) Biochemistry (in press).
15 - Wassink, J., and Mayhew, S. (1975) Anal. Biochem. 68, 609-616.
16 - Pajot, P. (1976) Eur. J. Biochem. 63, 263-269.
17 - Pajot, P., and Groudinsky, O. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 158-164.
18 - Baudras, A., Krupa, M., and Labeyrie, F. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 58-64.
19 - Capeillère-Blandin, C., Bray, R.C., Iwatsubo, M., and Labeyrie, F. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 549-566.
20 - Mulet, C. (1976) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paris-Sud.
21 - Goldberg, M. (1969) J. Mol. Biol. 46, 441-446.
22 - Truffa Bachi, P., Veron, M., and Cohen, G.N.(1974) Crit. Rev. Biochem. 2, 379-415.
23 - Guiard, B., Groudinsky, O., and Lederer, F. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci.USA 71, 2539-2543.
24 - Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974) Nature, 250, 194-199.
25 - Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C., Jensen, L.H., Legall, J., and Dubourdieu, M. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3185-3188.

Eur. J. Biochem. *111*, 357–367 (1980)
© by FEBS 1980

Spontaneous Dissociation of a Cytochrome Core and a Biglobular Flavoprotein after Mild Trypsinolysis of the Bifunctional *Saccharomyces cerevisiae* Flavocytochrome b_2

Michel GERVAIS and Mariella TEGONI

Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Received March 31 July 14, 1980)

Saccharomyces cerevisiae flavocytochrome b_2 is known as a bifunctional enzyme which behaves as the association of an FMN flavodehydrogenase with its specific acceptor, a b_5-like cytochrome. Mild trypsinolysis gives rise to three complementary fragments (n, X, β'), both prosthetic groups being still bound. After such proteolysis the separation of a biglobular flavoprotein domain (carrying FMN) from a cytochrome domain (with the heme) is obtained by molecular sieving under non-denaturing conditions.

The marked lack of affinity between the tetrameric flavoprotein $(X, \beta')_4$ and the monomeric cytochrome core (n) leads to the hypothesis that the two domains are not tightly associated in the native molecule and might move relative to each other. Their respective mobility is possibly required for the catalytic mechanism. The comparison with previous trypsinolysis studies on the flavocytochrome b_2 from *Hansenula anomala* suggests the presence of two common zones of hypersensitivity to proteases, along the protomeric polypeptide chain, and strongly supports the validity of the triglobular model for both flavocytochromes.

Both *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala* yeasts contain an L-lactate cytochrome *c* oxidoreductase: a flavohemoprotein currently called S and H flavocytochrome b_2, respectively. These two flavocytochromes are considered as homologous enzymes because they show many similarities: tetrameric quaternary structure [1–4], protomers of M_r about 60000 consisting of a unique polypeptide chain [4, 5] each binding one flavin mononucleotide and one heme [1, 2, 6, 7], heme spectra [2, 7], substrate specificity and functional mechanism [8, 9]. Nevertheless, marked differences are observed in their kinetic parameters [10] and in their interprotomeric binding forces [4].

In the absence of both X-ray crystallographic data and primary sequence, one may speculate on how large are the sequential and structural homologies between these two homofunctional enzymes issuing from different yeast species.

Indeed, a three-globular protomer model (n_H-ε_H-β_H) has previously been proposed to explain the behavior of the H-flavocytochrome b_2 with regard to proteases. Trypsin, for example, is able to cleave rapidly two polypeptide bridges on the protomer, giving rise to three fragments resistant to a further attack, and therefore supposed to be globular [11, 12]. After such a double event occurring with a small loss of peptide material ($\Sigma < 70$ amino acids residues), two molecular entities, a cytochrome core (globule n_H) and a flavodehydrogenase (formed of biglobular ε_H-β_H protomers) spontaneously separate in non-denaturing neutral buffer [11].

With the S-enzyme, a cytochrome core of M_r 11000 has been isolated and characterized [13–15], as formed after proteolytic attack by trypsin or various proteases; however those studies failed to reveal any flavoprotein entity. One may consider therefore whether or not the folding of the polypeptide chain of the S-enzyme was very different from that of its H-homologue and could fit the three-globules model implying a stable cytochrome and a stable flavoprotein domain as proposed for the H-enzyme [11].

Abbreviations. S-flavocytochrome b_2 and H-flavocytochrome b_2 enzymes prepared from *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala* yeasts respectively; S_t-flavocytochrome b_2, the form of the S-enzyme cleaved by yeast proteases during purification; buffer A, 0.3 M sodium DL-lactate, 50 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA; $PhMeSO_2F$, phenylmethylsulfonyl fluoride.

Enzyme. Flavocytochrome b_2 or L-lactate cytochrome *c* oxidoreductase (EC 1.1.2.3).

Our purpose was to investigate more thoroughly the polyglobular pattern of the S-enzyme and the possibility of isolating a flavoprotein domain, working under mild and quite controlled conditions for the trypsin attack, conditions under which Naslin et al. had detected the formation of three nearly complementary fragments from the protomeric chain [16].

MATERIALS AND METHODS

Flavocytochrome b_2

S_x-flavocytochrome b_2 was prepared from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (Société Industrielle Lesaffre, 59701 Marc en Barœul, France) in the crystalline form ('cleaved form'), following the procedure of Appleby and Morton [17], modified as previously described [10]. The enzyme, once deprived of its DNA component, was stored as a precipitate in ammonium sulfate at 70% saturation in buffer A solution (0.3 M sodium DL-lactate, 50 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA) pH 7.0 in the presence of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride ($PhMeSO_2F$) at 4 °C under nitrogen. In polyacrylamide/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis it shows a typical pattern of two bands (α and β).

Before each proteolysis, the required amount of stock suspension was centrifuged 10 min at 15000 × g, the precipitate was washed with a buffer similar to the storing buffer at 70% saturation ammonium sulfate but at pH 8 and without $PhMeSO_2F$. After a second centrifugation, the precipitate was dissolved in the minimum amount of the latter buffer without ammonium sulfate. The solution was then filtered through a Sephadex G-25 column (h = 10 cm; diameter = 1 or 2 cm depending on the enzyme volume), equilibrated in the same buffer, to separate the ammonium sulfate and $PhMeSO_2F$ still present. Only the first concentrated fractions (10–20 mg/ml) were used for further proteolysis studies.

Flavocytochrome b_2 concentration was spectrophotometrically determined from the γ band absorbance of dithionite-reduced heme, using $\varepsilon_{423\,nm}$ = 183 $mM^{-1}\,cm^{-1}$ [2] for the cleaved form and from γ band absorbance of oxidized heme using $\varepsilon_{413\,nm}$ = 121 $mM^{-1}\,cm^{-1}$ for the cytochrome b_2 core [15]. In all the experiments, the standard molar activity of S_x-flavocytochrome b_2, determined as previously described [10] was 180–225 s^{-1}.

Trypsin

We used trypsin (Worthington Biochemical Corporation) in which any possible residual chymotrypsin activity is inhibited by L-1-tosylamido-2-phenylethyl-chloromethyl ketone. Stock solutions in 0.1 mM HCl were at a concentration of 10–20 mg trypsin ml. Trypsin concentration was spectrophotometrically determined from 280-nm absorbance using an absorption coefficient of 1.5 $mg^{-1} \cdot ml \cdot cm^{-1}$ [18].

In all experiments trypsin activity was about 200 units as measured against N^{α}-tosyl-L-arginine methyl ester (TosArgOMe) [19].

$PhMeSO_2F$ came from Merck. Stock solutions in isopropyl alcohol were at a concentration of 100 mM and can be kept for months at room temperature [20].

Proteolysis

After addition of trypsin (at a chosen final concentration) to S_x-flavocytochrome b_2 solution, analytical and preparative proteolysis were carried out at 20 °C.

For analytical proteolysis, $PhMeSO_2F$ at a final concentration of 10 mM was immediately added to samples taken at different incubation times. The samples were then frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer before electrophoretic analysis. Other samples were simultaneously taken during proteolysis to follow: (a) the loss of S_x-flavocytochrome b_2 specific activity under standard assay conditions, (b) the flavin coenzyme release followed by a fluorometric method previously described [21].

The same three parameters were also followed during preparative proteolysis. After proteolysis was stopped at a convenient time (with $PhMeSO_2F$ at a final concentration of 7 mM), the bulk proteolysate was precipitated by ammonium sulfate at 70% saturation, centrifuged 10 min later at 15000 × g for 10 min at 4 °C. The pellet was then dissolved in the minimum amount of 0.1 M phosphate, 0.1 M DL-lactate buffer pH 7.0 and charged on a Sephadex G-150 column equilibrated with the same buffer. The proteolysate components were separated by molecular filtration.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Presence of Dodecylsulfate

$PhMeSO_2F$ at a final concentration of 10 mM was again added, just before the denaturation step, to the frozen protein samples taken in the course of proteolysis. Denaturation was achieved by addition of 1 vol. 0.1 M Tris pH 6.8, 4% sodium dodecylsulfate 4 mM EDTA, 2% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, and by a 10-min incubation at 85 °C.

Electrophoresis on 12.5% or 15% polyacrylamide gel in the presence of 0.1% sodium dodecylsulfate, was performed on vertical slabs, according to Douglas et al. [22] at a constant current of 11 mA for 15 h. The molecular weights of the S and H chains and their α subunits were derived by linear regression from a standard calibration curve obtained by plotting log of molecular weight versus migration distance (in mm) from the insertion line, of the following standard proteins charged on the same gel: bovine

serum albumin (68000), catalase (60000), immunoglobulin G subunit I (52000) and lactate dehydrogenase (beef heart) (36000). The molecular weights of other fragments were deduced from a standard regression line obtained with: immunoglobulin G subunit II (23500), soya bean trypsic inhibitor (21500), β-lactoglobulin (18400), myoglobin (17200) and egg white lysozyme (14300).

Determination of Rate Constants

Positive transparencies of gels were scanned on a Joyce-Loebl chromoscan microdensitometer. Concentration of a given species is proportional to its percentage of coloration expressed as the ratio between the surface of its densitometric peak and the total surface under the densitometric trace of the run, following the method previously described [16]. Total surface is calculated as the sum of the surfaces of all the fragments present on a definite run and does not significantly vary with time. Coloration due to trypsin is negligible, as compared to each fragment's coloration.

The species' concentrations are reported versus time in a semilogarithmic plot; slopes of the straight lines obtained by linear regression represent the first-order apparent rate constants of the processes.

Amount of Bound and Free Flavin

FMN content of flavocytochrome b_2 or its derivatives was determined by fluorometric measurement on a fluorometer built by Dr M. Iwatsubo and described in [23]. When excited at 450 nm, free flavin is fluorescent (maximum emission 536 nm), whereas bound flavin fluorescence is completely quenched.

Total content of flavin in a given sample was obtained by measuring fluorescence intensity after complete denaturation in 6 M urea, conditions under which all the flavin is dissociated. Free flavin content in the same sample was determined in neutral buffer. Final concentration of flavoprotein in the fluorimetric measurement was about 0.1 µM, that is 1000 times higher than the flavin dissociation constant under the same conditions [23]. The absolute values of FMN concentrations were calculated by comparison with the fluorescence intensity of an FMN solution of known molarity [21].

Measurement of Tryptophan Content

Tryptophan content of fractions obtained from molecular sieving of the hydrolysate was measured by the fluorometric internal calibration method previously described [24, 25]. Excitation wavelength was 295 nm. Fluorescence intensity was read at the maximum emission peak.

RESULTS

Characteristics of Trypsin Reaction on $(\alpha\beta)_4$ S_x-Flavocytochrome b_2 in the Presence of Lactate

In our experiments, the starting enzyme (Fig. 1, run 1) exhibits an $(\alpha + \beta)$ pattern; however, in the high-resolution gel (15% acrylamide), beside these two main α and β bands, minor additional bands are detected: one corresponds to a molecular weight of about 61000 and is probably the S protomer that escaped cleavage by yeast proteases during preparation, and cocrystallized with the cleaved form; another minor component is a short α, and finally β itself appears to be resolved into two distinct components with a molecular weight difference reaching a maximum of 500.

Considering the evolution of the acrylamide, dodecylsulfate gel electrophoresis pattern during proteolysis, the first detectable event is a decrease in concentration of the β_s species (M_r 25100) with concomitant quantitative increase of a species called β'_s (M_r 22600) (Fig. 1 and 2) slightly lighter by about 25 residues.

As shown in Fig. 3, the $\beta_s \rightarrow \beta'_s$ interconversion is found to be synchronous with a marked activity decrease ($210\ s^{-1} \rightarrow 20-25\ s^{-1}$). During this process, the α_s fragment remains stable towards trypsin attack and no FMN release is detectable, thus strongly suggesting that the loss of about 25 amino acids from β_s is the only event responsible for such a fall of activity.

In other experiments with higher trypsin concentrations, we were able to follow the further evolution of α_s and β'_s (Fig. 4); the transformation $\beta_s \rightarrow \beta'_s$ is almost already completed when detectable changes can be observed at the level of α_s. Degradation of α_s occurs relatively more slowly than $\beta \rightarrow \beta'$ and is accompanied by the appearance (Fig. 4, Table 1 and Fig. 5) of two new major bands: X_s (M_r 24900) and n_s (M_r 12900), as evidenced in polyacrylamide dodecylsulfate gel electrophoresis tests. Because of the comparable rate constants for the appearance of X_s and n_s (Table 1, Fig. 5) and due to their complementary molecular weights (Table 2) the cleavage along α_s seems to be punctual and in accord with $\alpha_s \rightarrow X_s + n_s$; the locus was called 'd' according to the previous nomenclature [16]. During α_s cleavage, the previously formed β'_s fragment remains undegraded.

In spite of their close positions in the gels, the distinction between X_s and β_s bands is evident since β_s, present at time zero, disappears entirely and rapidly yielding β'_s (run $1 \rightarrow 3$, Fig. 4), whereas X_s appears much more slowly (run $3 \rightarrow 9$) at the expense of α_s, and at the place where β_s formely stood. The values of the catalytic rate constant v [E] (calculated as k_{app} [S] [E] for each single process are listed in Table 1

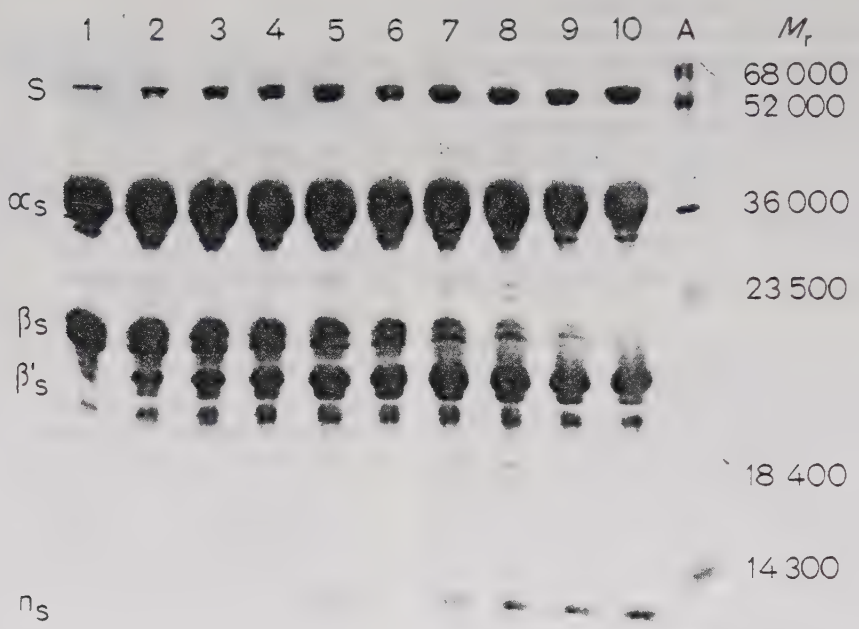

Fig. 1. *Electrophoretic pattern of S_x-flavocytochrome* b_2 *submitted to mild trypsinolysis.* Acrylamide/bisacrylamide 15%, sodium dodecylsulfate 0.1%. S_x-flavocytochrome b_2 (100 μM) was incubated with trypsin (final concentration 0.1 μM) in buffer A (300 mM DL-lactate, 50 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA) pH 8.0 at 20 °C. Aliquots were taken before the addition of trypsin (first run) and during proteolysis (runs 2–10) at the following times: 7 min, 15 min, 22 min, 33 min, 40 min, 62 min, 80 min, 100 min, 137 min. The samples were then treated as described in Materials and Methods before being loaded on a vertical slab together with a pool of standard proteins used for internal calibration (run A): bovine serum albumin, M_r 68000; immunoglobulin G subunit I, M_r 52000; lactate dehydrogenase (beef heart), M_r 36000; immunoglobulin G subunit II, M_r 23500; β-lactoglobulin, M_r 18400; lysozyme (egg white) M_r 14300

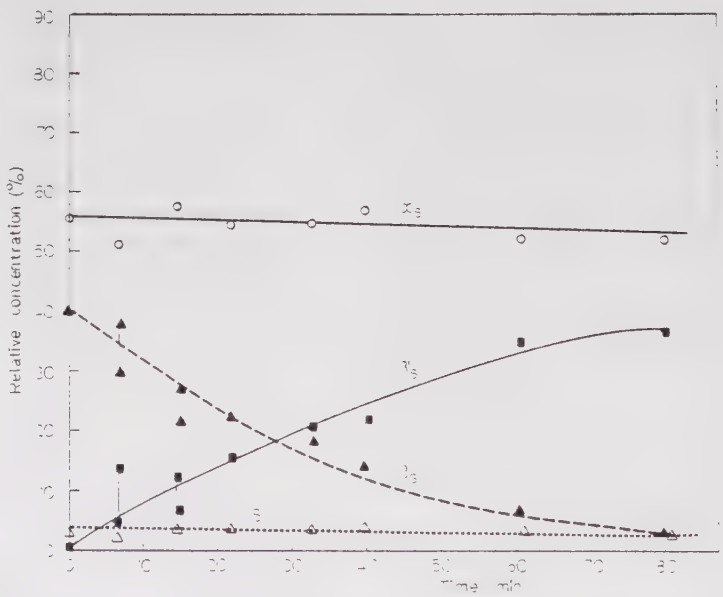

Fig. 2. *Time course evolution of S_x-flavocytochrome* b_2 *polypeptide fragments obtained by mild trypsinolysis.* Relative concentrations (in terms of coloration) of the protein components of the hydrolysate were determined by densitometric measurement of transparent positives slides of the gel presented in Fig. 1, as described in [16] and summarized in Materials and Methods

We can define a global degradation diagram

$$S \rightarrow \alpha_s + \beta_s + \text{peptides} \quad \text{(locus a')} \qquad (1)$$
$$\beta_s \rightarrow \beta'_s + \text{peptides} \quad \text{(locus b)} \qquad (2)$$
$$\alpha_s \rightarrow X_s + n_s \quad \text{(locus d).} \qquad (3)$$

As compared to these cleavage processes, the dissociation of flavin mononucleotide is slow (Fig. 6). In particular when S_x-flavocytochrome b_2 is entirely cleaved into ($n_s + X_s + \beta'_s$) and 95% of the activity is lost, only 10% of the FMN is dissociated (Fig. 6).

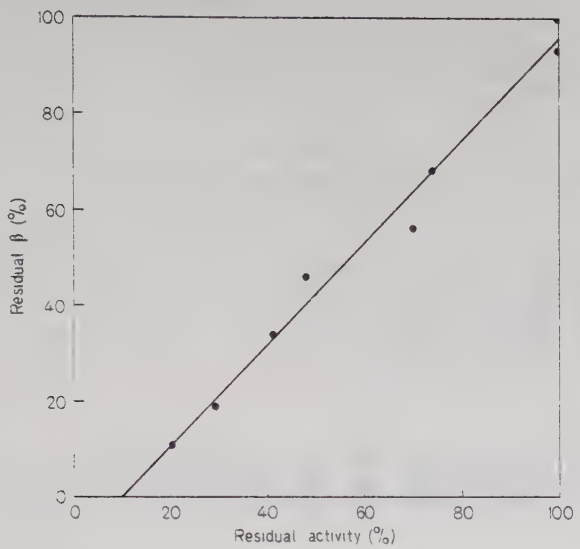

Fig. 3. *Correlation between percentage of undegraded β_s species and residual L-lactate ferricyanide reductase activity in the course of trypsinolysis.* Proteolytic conditions are as in Fig. 1 and 2. Points on the figure correspond to aliquots taken at each of the times indicated in the legend of Fig. 1. Concentration of residual β is calculated in terms of coloration on each gel; the value before addition of trypsin is taken as 100%. Residual molar activity, expressed as percentage of the initial one (225 s^{-1}), was assayed under standard conditions (see Materials and Methods)

The catalytic rate constants of these processes are also reported in Table 1.

Spontaneous Dissociation of the Cytochrome Domains from the Bulk Tetrameric Flavoprotein Domain after Controlled Trypsin Cleavage

At the stage of trypsinolysis where nearly all the intact chains have been cleaved at loci a', b and d into n_s, X_s and β'_s polypeptide fragments, it was important to know which were the stable molecular species present in neutral buffer. To that end, molecular sieving of the proteolysate (treated as described in Materials and Methods) was achieved on a Sephadex G-150 column (Fig. 7): a complete separation is observed between a fast yellow component, a flavoprotein (peak I, Fig. 7) and a slow red component, a cytochrome (peak II). Comparing their elution volumes with those of standard proteins, their molecular weights can be roughly estimated to be 200000 and < 20000, respectively. Electrophoretic analysis of the fractions corresponding to each of the two peaks is presented in Fig. 8. We can identify the constituent of peak II with fragment n, which probably is (on the basis of its molecular weight and also of its heme spectrum) the cytochrome core already described [13, 15].

Peak I contains (as seen on gels after standard dodecylsulfate electrophoresis) two major components, X_s and β'_s, together with some minor bands (Fig. 8). On the basis of its absorption spectrum and fluorometric measurement, flavin is observed as the main constituent of its prosthetic group, but heme is also present in these fractions (Fig. 7) at concentrations varying in different experiments from 7% to 20% of flavin concentration. In the fractions corresponding to flavoprotein (peak I) the maximum amount of α or n fragment is 1% under our experimental conditions (Fig. 8). The most likely possibility, at least in this case, is that the contaminating heme is carried by residual intact S protomer.

Analysis of the FMN/tryptophan and heme/tryptophan ratios in peak I and peak II (Fig. 7) and in the initial flavocytochrome is in agreement with a molar ratio of 0.8 mol FMN per mol ($X\beta'$) protomer and of 1.0 mol heme per mol n protomer. There is a slight shortage in flavin: 0.8 mol FMN/4 mol tryptophan instead of 1 mol FMN/4 mol tryptophan expected from the distribution of the five tryptophan residues present [25] in the cleaved '$\alpha\beta$', that is four in the flavoprotein and one in the cytochrome domain [26]. This shortage is due to a partial flavin dissociation taking place during the molecular sieving. Some FMN is actually eluted as a free flavin after peak II of the cytochrome core (Fig. 7).

The yield in flavoprotein domain after proteolysis and molecular sieving is 37% in the experiment shown (Fig. 7) and reaches 55% in other experiments. The yield in cytochrome b_2 core is currently 90% taking into consideration the amount of core remaining in the supernatant of the centrifugation after ammonium sulfate precipitation and before Sephadex G-150 column chromatography.

When proteolysis is too short, contamination of the flavoprotein domain with undegraded α chains, that is with heme, increases. On the other hand, when proteolysis is too long, the yield in flavoprotein decreases. In fact, the stability of this *S. cerevisiae* T-flavoprotein towards ulterior trypsin attack is low as compared to the high stability observed in the case of H-flavocytochrome b_2 T-flavoprotein [27].

In conclusion, the trypsinolysis of S_x-flavocytochrome b_2 carried out under controlled conditions yields two kinds of molecular species: molecules of M_r 12000 that are cytochrome b_2 core, and molecules of high molecular weight, the main component of which are tetramers $(X\beta')_4$, $M_r = 4 \times (24900 + 22600)$, bearing flavin as the main prosthetic group. These two domains spontaneously dissociate in neutral buffer, even at concentrations as high as 100 µM.

DISCUSSION

Earlier studies upon S-flavocytochrome b_2 had revealed the hypersensitivity to proteases of a few zones of the native protomeric chain. The first proteolytic

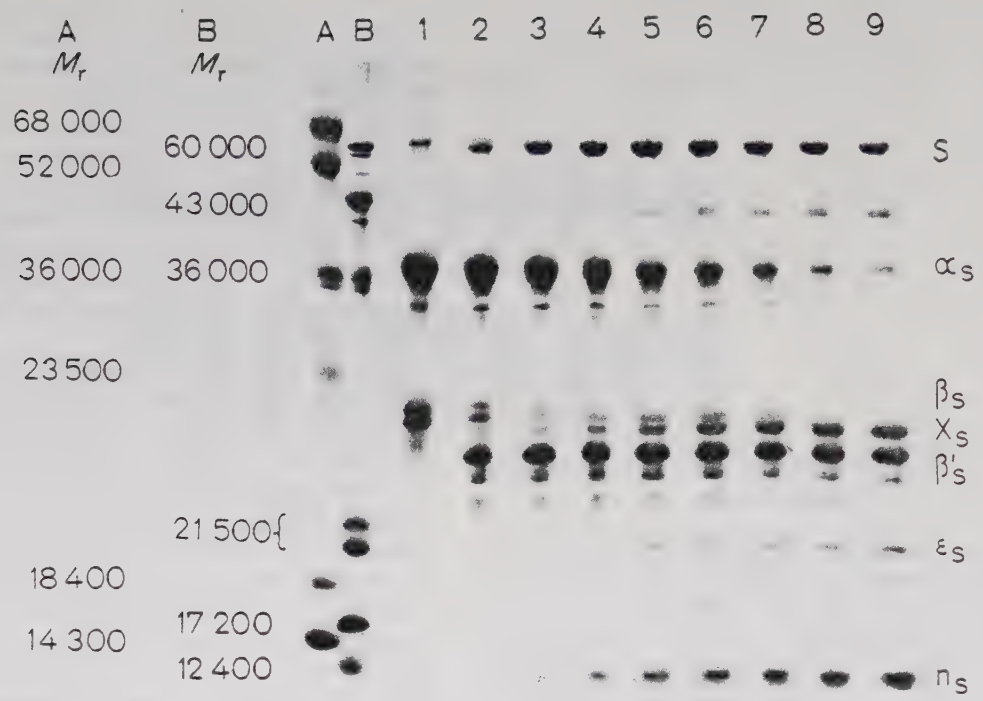

Fig. 4. *Electrophoretic pattern of S_x-flavocytochrome* b_2 *in the course of trypsinolysis.* Acrylamide 12.5%, sodium dodecylsulfate 0.1%. S_x-flavocytochrome b_2 (91 μM) was incubated with trypsin (1.7 μM) in buffer A pH 8.0, 20 °C. Aliquots were taken before starting the proteolysis (run 1) and at the following times: 3 min, 6 min, 10 min 30 s, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min, 80 min (runs 2–9). Internal calibration was achieved by simultaneous running of two pools of standard proteins; run A: bovine serum albumin, M_r 68000; immunoglobulin G subunit I, M_r 52000; lactate dehydrogenase (beef heart), M_r 36000; immunoglobulin G subunit II, M_r 23500; β-lactoglobulin, M_r 18400; lysozyme (egg white), M_r 14300; run B: catalase, M_r 60000, ovalbumin, M_r 43000; lactate dehydrogenase (beef heart), M_r 36000; soya trypsin inhibitor, M_r 21500; myoglobulin, M_r 17200; cytochrome *c* (horse heart), M_r 12400

Table 1. k_{cat} *values in different experiments*

In order to compare the same phenomena in different experiments, k_{cat} was calculated as v [E], that is $k_{app} \times$ [S] [E] where [S] is the concentration of S-flavocytochrome b_2 and [E] the concentration of trypsin. FMN dissociation was also calculated as described above by supposing that the process is limited by proteolytic events. The concentrations of trypsin and flavocytochrome b_2 in the four experiments shown were respectively: [trypsin] = 0.1 μM (A), 4.3 μM (B), 1.07 μM (C), 4.3 μM (D), and [S-flavocytochrome b_2] = 100 μM (A), 45 μM (B), 89 μM (C), 108 μM (D). In certain cases we have indicated only the limit values (l) of k_{cat}; in fact the catalytic rate constants for rapid and slow processes cannot be determined with equal accuracy in a single experiment

Reaction	k_{cat} in experiment			
	A	B	C	D
1st phase activity decrease	0.43		0.48	> 0.16 (l)
2nd phase activity decrease			3.5×10^{-3}	4.8×10^{-3}
FMN dissociation		2.6×10^{-4}	7.6×10^{-4}	1.1×10^{-4}
$\beta_s \rightarrow \beta'_s$ conversion (cleavage at b)	0.57	> 0.28 (l)	0.62	> 0.27 (l)
α_s degradation (cleavage at d)	$< 8 \times 10^{-2}$ (l)	0.60×10^{-2}	4.8×10^{-2}	3.1×10^{-2}
X_s formation (cleavage at d)		1.1×10^{-2}		4.0×10^{-2}
n_s formation (cleavage at d)		1.6×10^{-2}		3.4×10^{-2}
β'_s degradation		$< 6 \times 10^{-5}$ (l)		$< 2.2 \times 10^{-4}$ (l)

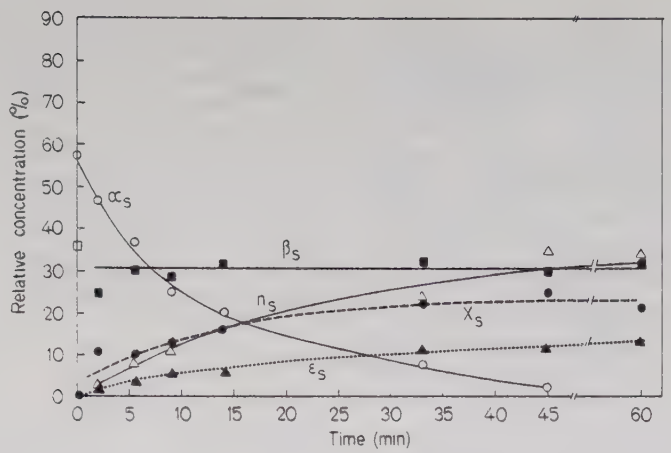

Fig. 5. *Time course evolution of S_x-flavocytochrome* b_2 *trypsin fragments.* Proteolysis conditions: S_x-flavocytochrome b_2: 108 μM, trypsin 4.3 μM in buffer A pH 8.0 at 20 °C. The kinetic evolution of different species during the trypsinolysis (experiment D in Table 1) was calculated as in Fig. 2

Table 2. *Molecular weight determination of S and H flavocytochrome protomers and their trypsin fragments.* The molecular weights presented in the table are average values on 5–20 determinations on distinct gels. The errors next to each value represent the standard deviations (σ). For H-enzyme, the molecular weights given have been redetermined on slab gels, under the same electrophoretic conditions used for S-enzyme (12.5% or 15% acrylamide, 0.1% sodium dodecylsulfate, constant-current migration). Different experiments were performed in which the comparison of the two flavocytochrome b_2 and their fragments was achieved by co-migration on a same run and parallel migration on the same slab. The H-protomer presents a significantly higher migration rate than the S-protomer, suggesting that it is about 10 amino acids shorter in its polypeptide chain; in fact, no identity can be detected between homologous fragments. It must be underlined that the present determination leads to values higher than previously reported ones [16]

S-enzyme fragment	Molecular weight	σ	Number of determinations	H-enzyme fragment	Molecular weight	σ	Number of determinations
Protomer S	61600	2200	9	Protomer H	60600	1450	16
α_s	37900	1200	8	α_H	38500	1200	20
β_s	25100	2000	8	β'_H	21300	1900	19
X_s	24900	2800	5	X_H	23900	2000	13
β'_s	22600	1900	5	ε_H	16700	1200	10
ε_s	18400	1500	5	n_{1H}	14600	800	9
n_s	12900	400	5	n_{2H}	13800	800	7

cleavage can be achieved by *Saccharomyces cerevisiae* proteases [5] and results in fragmentation of the so-called 'intact' protomeric chain (form I, Fig. 9) into two pseudo-complementary fragments called α_s and β_s (form II).

Trypsin degradation of form II produced shortening of β into β' defining form III and then cleavage of α itself into $n + \varepsilon$ with a loss of about 70 amino acids residues in form V [16].

Our study concerns mainly the reinvestigation of trypsin degradation pattern of form II in new buffer conditions in the presence of the substrate, L(+)lactate and at pH 8.0, the reliability between cleavage and molecular activity and the separation after cleavage of two molecular entities: a cytochrome and a flavoprotein.

Trypsin Degradation Pattern of S_x-Flavocytochrome b_2, *Form II*

Under our conditions, the $\beta_s \rightarrow \beta'_s$ process (cleavage at locus b) takes place with a loss of peptide material evaluated here to about 25 residues (probably not significantly different from the previously estimated 13–15 residues [16]. We have not established, up to now, whether locus b is located at the N-terminal side of β (i.e. near locus a) or at the C terminus.

The first cleavage taking place on α_s (M_r 37900) at locus d yields two fragments X_s and n_s (our estimated M_r 24900 and 12900, respectively) that appear to be complementary in weight, with no detected loss of peptides. We call form IV the resulting new form $nX\beta'$.

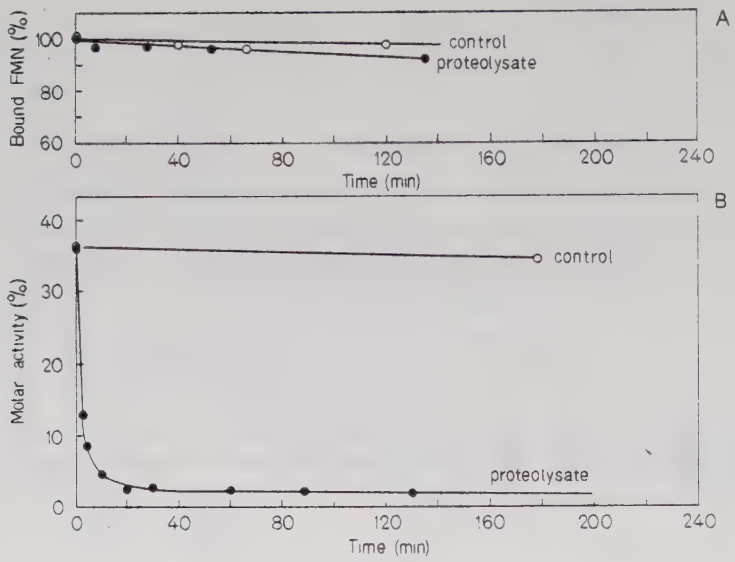

Fig. 6. *FMN dissociation (A) and specific activity decrease (B) during trypsinolysis of S_x-flavocytochrome* b_2. (A) Amount of FMN was measured as described in Materials and Methods. Percentage of bound flavin was determined as a function of time in the absence (○) and the presence (●) of trypsin. (B) Specific molecular activity was assayed under standard conditions (cf. Materials and Methods) for flavocytochrome b_2 in the absence (○) and in the presence (●) of trypsin and expressed as percentage of the activity of the intact form I (500 s^{-1}). The two plots refer to a single experiment in which S_x-flavocytochrome b_2 concentration was 88.8 μM and trypsin concentration 1.07 μM. Trypsinolysis was carried out in buffer A pH 8.0 at 20 °C

In contrast with former experiments [16], under our conditions X_s is momentarily stable and not immediately degraded into a smaller form ε_s. In other words the loop between loci c and d does not suffer a degradation and remains attached to ε_s within the X_s fragment. A possible explanation of the resistance of X_s fragment towards extensive attack by trypsin is that the presence of the substrate L(+)lactate has a protective effect on this fragment. In fact the localisation of the catalytic active site on this part of the α fragment together with an hypothetical reduction-induced conformational change have already been reported [28, 29].

The degradation scheme (Fig. 9), which agrees with the time course of degradation and formation of the various fragments and with their molecular weights, is very similar to that presented in former studies of S_x-flavocytochrome b_2 degradation by trypsin at pH 7 in a lactate-free medium [16], and of H-flavocytochrome b_2 degradation by trypsin in the same buffer as that used here [11, 27]. Nevertheless some differences must be emphasized: with the H-enzyme, the various intermediates found for the S-enzyme (forms I to V as discussed above) were not all detectable [27]. The first intermediate accumulating after trypsin attack of H-enzyme, form I, resembles form III more than form II. Indeed, out of the two so-called α_H and β_H fragments formed, β_H is more similar to β'_s than to β_s, first by its molecular weight, and secondly because of the specific activity decrease correlated with its formation, as summarized (Fig. 9).

Two hypotheses are proposed to explain this behavior, as follows.

a) In the H-enzyme the first cleavage actually gives rise to an ($\alpha\beta$) form, but suddenly, a second faster cleavage at locus b also occurs, and the resulting ($\alpha\beta'$) form is the only accumulating, and thus detectable, species.

b) In the H-enzyme the first detected proteolytic intermediate ($\alpha\beta'$) is obtained after a single cleavage at a locus close to locus a but involving residues crucial for the enzyme activity.

Recent experiments (Gervais, M. and Corazzin, S., unpublished results) concerning cleavage of the H-protomer by clostripain, which is able to cleave arginine residues preferentially, shows than an intermediate of type II exists between form I and form III, with a standard activity of about 15% of the initial one. This argument supports the first hypothesis. If now we turn our attention to the events taking place along the α chains, a marked difference must be underlined between the behaviours of the H and S enzymes since, in contrast with the experiments presented here for S-enzyme, cleavage of α_H into two fragments is always achieved with degradation of the cd loop.

Correlations between Trypsin Cleavages and Variation of the Functional and Structural Parameters of S_x-Flavocytochrome b_2

As shown here, the trypsin conversion of form II ($\alpha\beta$) into form III ($\alpha\beta'$) (cleavage at b) with a loss of

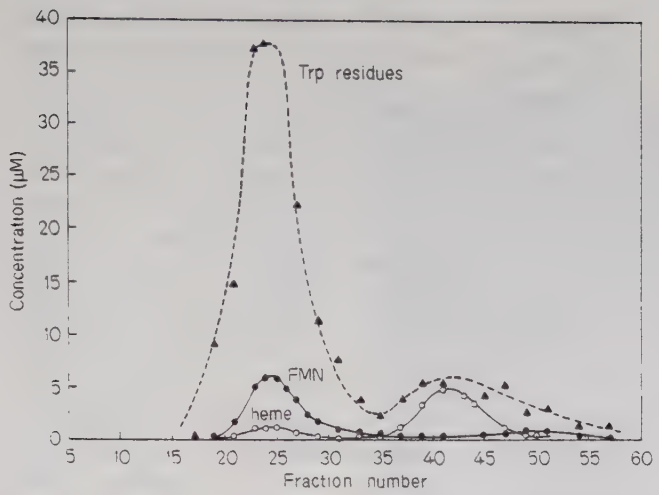

Fig. 7. *Molecular sieving of S_x-flavocytochrome* b_2 *trypsin hydrolysate on Sephadex G-150.* In this experiment S_x-flavocytochrome b_2 and trypsin concentrations were respectively 44.6 μM and 4.3 μM. Trypsinolysis was carried out in buffer A pH 8.0, 20 °C during 96 min and stopped by addition of $PhMeSO_2F$ (final concentration 7 mM). The proteolysate (2 ml) was concentrated by precipitation with ammonium sulfate at 70% saturation and centrifuged. Under such conditions the ammonium sulfate precipitation is not quantitative and a large amount (45%) of cytochrome b_2 core remains in the supernatant. The red pellet was redissolved in 0.1 M phosphate, 0.1 M DL-lactate buffer, pH 7.0 and loaded on a Sephadex G-150 column (0.9 × 60 cm) equilibrated in the same buffer. The elution flow rate was 0.16 ml/min. Fractions of 0.9 ml were collected and analyzed in order to determine: heme content by spectrophotometry (○), total FMN (●) and tryptophan (▲) contents by fluorimetry and the nature of their polypeptide components by electrophoresis (cf. Fig. 8). In the experiment shown, the yield of flavoprotein was 39%, as calculated by the ratio of FMN in the flavoprotein peak/total FMN before proteolysis. Yield of bound heme, taking into account the 45% present in the supernatant before the column, and the 37% in peak II, was 82% of the initial total amount. 7% of heme is recovered as contaminant of the flavoprotein (peak I)

about 25 amino acids residues determines a marked decrease of molecular activity under standard assay conditions. From 40%, for form II, it falls to 5% of the initial activity for form III. No flavin release intervenes during this process. The quaternary structure of the ($\alpha\beta'$) form has not been analysed in detail, this transient form being not yet isolated from the other proteolytic components. Anyway, the tetrameric structure of $X\beta'$ indicates that the $\alpha\beta'$ structure must also be tetrameric.

The amino acids residues (≈ 25) lost in the process $\beta \rightarrow \beta'$ thus appear to play an important direct or indirect role on the molecular activity and it would be interesting to obtain information on the particular process modified by the cleavage at locus b.

After the transformation of form III into form IV by a third pseudo-punctual cleavage at locus d, yielding the three fragments n_s, X_s and β'_s with no detectable new loss of peptides, we observe the spontaneous dissociation of the whole tetramer molecule into two molecular species, each corresponding to one functional domain: the cytochrome core, which corresponds to the monomeric species n_s, and the flavoprotein which corresponds to ($X\beta'$) protomers possibly in a tetrameric quaternary structure. After this cleavage the standard ferricyanide reductase activity is usually 2% of the initial one (form I). We cannot say at the present time whether this activity is due to the flavoprotein itself, to the ($\alpha\beta'$) protomers still present, or to apparently intact S protomers, as detected in electrophoresis gels.

Interactions between Cytochrome and Flavoprotein Moieties in Flavocytochrome b_2

After cleavage of both S and H form III in the cd loop, monomeric cytochrome cores dissociate spontaneously from the tetrameric flavoprotein. For the S-enzyme, after separation of these two entities by molecular sieving as achieved here, the flavoprotein species was contaminated with 7–20% heme. As stated in Results, this heme might *a priori* be bound to intact S chains. Anyway the amount of cytochrome core present is negligible (less than 1%). It is therefore possible to conclude that the dissociation constant of the flavoprotein cytochrome complex is higher than 10^{-4} M.

One important problem has to be discussed: are these two functionally dependent domains strongly associated in the native enzyme? In experiments with the H-enzyme, the lack of affinity between the cytochrome core and the flavoprotein entities could have been due to the destruction of the cd loop. The situation is therefore much clearer for the S-enzyme. In fact if after cleavage at locus d without apparent loss of peptide material there were no affinity at all in neutral buffer, one could probably assume that both domains in the intact enzyme are not in close contact and move freely, relative to each other, with locus d as a hinge between them. It must be kept in mind, however, that in both cases the conformational change that could follow the peptide cleavage might considerably alter the binding association between domains.

Triglobular Structure of H and S Flavocytochrome b_2

The existence of loci presenting a particular sensitivity to proteases, along a folded polypeptide chain of a native protein, is now widely recognized as a valuable indication that such loci correspond to regions in which this chain forms a loop, (a) protruding on the surface of the molecule, (b) able to fit the active crevice of proteases, and (c) in which peptide bonds are not thermodynamically stabilized by strong interactions. The resulting proteolytic fragments usually represent 'globules' in the protein; these globules

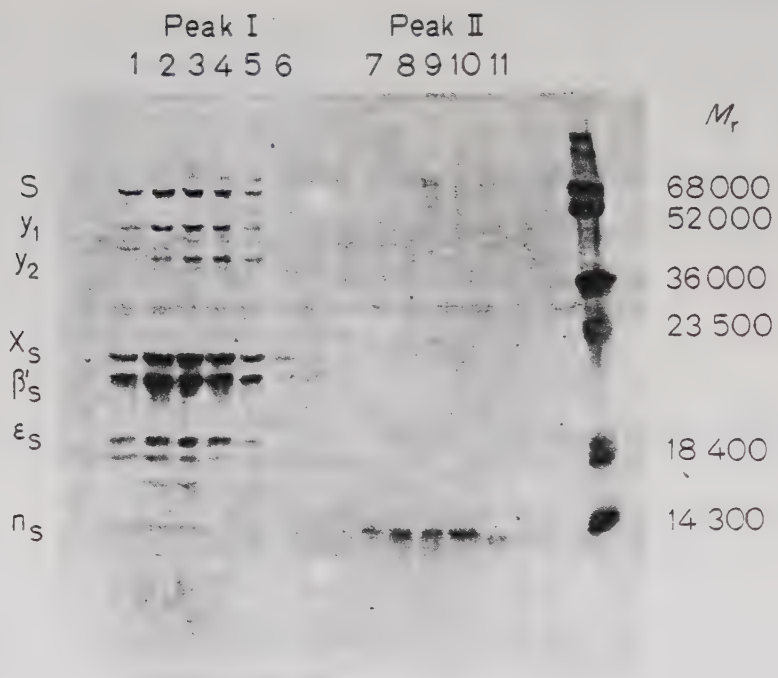

Fig. 8. *Electrophoretic analysis of the fractions eluted form the Sephadex G-150 column.* Fractions obtained by the molecular sieving presented in Fig. 7 were tested in polyacrylamide/dodecylsulfate electrophoresis as described in Materials and Methods. Fractions were loaded on the gel following the order of elution. On the left (runs 1–6) fractions 22, 24, 26, 28, 30 (peak I of Fig. 7) indicate that the main component chains in the flavoprotein peak are X_s and β'_s in equal amounts, contaminated with ε (resulting from the degradation of X). In this fraction of molecular weight > 150000 traces of undegraded protomers are also present. The actual origin of the two electrophoretic minor bands y_1 and y_2, which do not seem to be the products of the S protomer, cannot yet be explained. On the basis of their molecular weights, they may be tentatively assimilated to reassociated ($X\beta'$) and ($\varepsilon\beta'$) protomers. The reason for such associations resisting the denaturing treatment before electrophoresis has not yet been established. On the right (runs 7–11) fractions 38, 40, 42, 44, 46 (peak II of Fig. 7) indicate that peak II contains only n, the cytochrome b_2 core. An internal molecular weight calibration was simultaneously loaded (run A) (see Fig. 1 and 4)

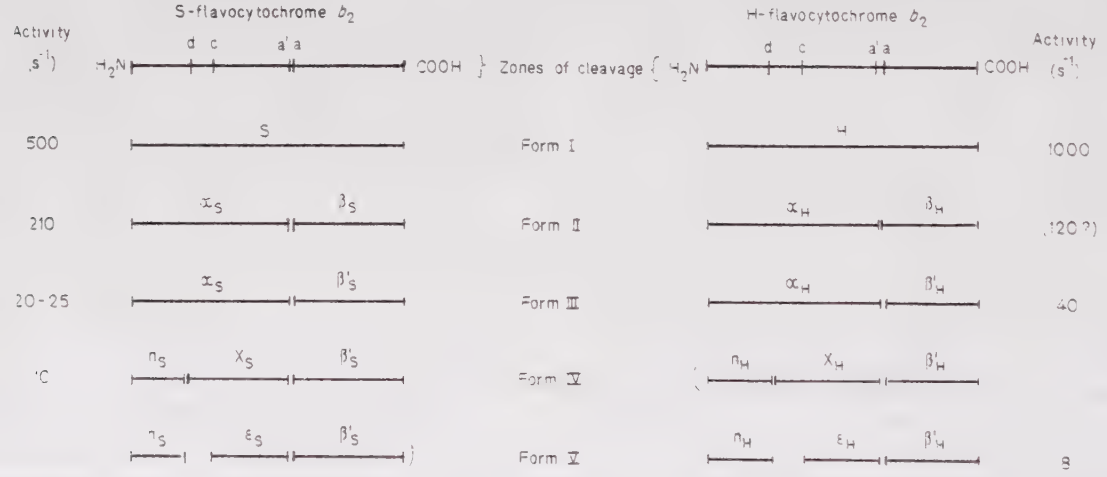

Fig. 9. *Degradation scheme of S and H-flavocytochrome* b_2 *under trypsin action.* On the left: scheme of degradation of S-flavocytochrome b_2. The first step (cleavage at locus a') was first seen as resulting from the action of yeast proteases and then of subtilisin and chymotrypsin. It takes place also with trypsin (Labeyrie, F. and Tegoni, M., unpublished results). The following steps have been characterized in the present and earlier studies. Locus b has been arbitrarily located at the same place as the already described locus a [16]. On the right scheme of degradation of H-flavocytochrome b_2. This derives from a former degradation scheme with the following modifications. In order to normalize this scheme with that of the S-enzyme, it has been assumed that the species usually called β_H, accumulating in the first detectable trypsinolytic event is actually similar to β'_s (form III) and not to β_s (see text). In fact a 'true β_H' (form II) homologous to β_s has recently been discovered as resulting from clostripain action (Gervais, M. and Corazzin, S., unpublished results). The two forms in parentheses have not been characterized in details because of their low stability. The choice of the same letters (d, c, a', a) to define the proteolytic loci for both enzymes does not necessary implies an exact identity of location of these loci along the two homologous protomeric chains

correspond to independently folding units originating most probably from an ancestor that was an independent protein [30]. The association, within flavocytochrome b_2, of one biglobular flavoprotein domain with one cytochrome unit which proved to be homologous to several b_5-like cytochromes (microsomal cytochrome b_5 [31], sulfite oxidase core [32]) can be interpreted as resulting from a fusion between the two functional units during the course of evolution. This fusion might have taken place at the level of DNA strands as classically admitted, but could as well have been achieved (according to recent findings on RNA processing) [33] at the level of maturation of pre-messenger RNA. As no yeast mutants affected in the flavocytochrome b_2 function have ever been detected there is presently no way to decide between these alternatives.

We greatly thank Dr F. Labeyrie, in whose laboratory the experiments have been performed, for fruitful advice and discussions all along this work. We are also indebted to Dr O. Groudinsky for the communication of her preliminary experiments and Mrs D. Lapointe for her help in preparing this manuscript. One of us (M. Tegoni) has been granted a European Molecular Biology Organization long-term fellowship (ALTF 199-1978).

REFERENCES

1. Jacq, C. & Lederer, F. (1970) *Eur. J. Biochem. 12*, 154–157.
2. Pajot, P. & Groudinsky, O. (1970) *Eur. J. Biochem. 12*, 158–164.
3. Monteilhet, C. & Risler, J. L. (1970) *Eur. J. Biochem. 12*, 165–169.
4. Labeyrie, F. & Baudras, A. (1972) *Eur. J. Biochem. 25*, 33–40.
5. Jacq, C. & Lederer, F. (1972) *Eur. J. Biochem. 25*, 41–48.
6. Morton, R. K., Amstrong, J. Mc. D. & Appleby, C. A. (1961) in *Haematin Enzymes* (Falk, J. E., Lemberg, R. & Morton, R. K., eds) p. 501, Pergamon Press, New York.
7. Baudras, A. & Spyridakis, A. (1971) *Biochimie (Paris) 53*, 943–955.
8. Capeillère-Blandin, C., Bray, R. C., Iwatsubo, M. & Labeyrie, F. (1975) *Eur. J. Biochem. 54*, 549–566.
9. Capeillère-Blandin, C. (1975) *Eur. J. Biochem. 56*, 91–101.
10. Labeyrie, F., Baudras, A. & Lederer, F. (1978) *Methods Enzymol. 53*, 238–256.
11. Gervais, M., Groudinsky, O., Risler, Y. & Labeyrie, F. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 77*, 1543–1551.
12. Gervais, M., Risler, Y., Capeillère-Blandin, C., Vergnes, O. & Labeyrie, F. (1979) in *Limited Proteolysis in Microorganisms* (Cohen, G. N. & Holzer, H., eds) Dept Health, Education & Welfare publication NIH 79-1591, pp. 227–234, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
13. Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y. & Naslin, L. (1966) *Biochim. Biophys. Acta, 128*, 492–503.
14. Watari, H., Groudinsky, O. & Labeyrie, F. (1967) *Biochim. Biophys. Acta, 131*, 592–594.
15. Groudinsky, O. (1972) Doctoral Thesis, University of Paris.
16. Naslin, L., Spyridakis, A. & Labeyrie, F. (1973) *Eur. J. Biochem. 34*, 268–283.
17. Appleby, C. A. & Morton, R. K. (1959) *Biochem. J. 71*, 492–499.
18. Laskowski, M. (1955) *Methods Enzymol. 2*, 32.
19. Hummel, B. C. W. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol. 37*, 1393.
20. James, G. T. (1978) *Anal. Biochem. 86*, 574–579.
21. Iwatsubo, M. & Capeillère, C. (1967) *Biochim. Biophys. Acta, 146*, 349–366.
22. Douglas, M. G., Finkelstein, D. B. & Butow, R. A. *Methods Enzymol. 56*, 58–66.
23. Iwatsubo, M. & di Franco, A. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol. 47*, 891–910.
24. Ninio, M., Pajot, P. & Labeyrie, F. (1971) *Biochimie (Paris) 53*, 35–41.
25. Pajot, P. (1976) *Eur. J. Biochem. 63*, 263–269.
25. Guiard, B., Groudinsky, O. & Lederer, F. (1973) *Eur. J. Biochem. 34*, 241–247.
27. Gervais, M. (1976) *Thèse de 3ème Cycle*, Biologie Cellulaire, Université Paris-Sud Centre d'Orsay.
28. Mulet, C. (1976) *Thèse 3ème Cycle*, Orsay, France.
29. Mulet, C. & Lederer, F. (1977) *Eur. J. Biochem. 73*, 443–447
30. Kirschner, K. & Bisswanger, H. (1976) *Annu. Rev. Biochem. 45*, 143–166.
31. Guiard, B., Groudinsky, O. & Lederer, F. (1974) *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 71*, 2539–2543.
32. Guiard, B. & Lederer, F. (1977) *Eur. J. Biochem. 74*, 181–190.
33. Kolata, G. B. (1980) *Science (Wash. DC) 207*, 392–393

M. Gervais, Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

M. Tegoni, Istituto di Biologia Molecolare, Università degli Studi di Parma, Via del Taglio, I-43100 Parma, Italy

DISCUSSION I

I - NOMEMCLATURE DES STRUCTURES TERTIAIRES DES PROTEINES

A - Introduction

La communication des idées se heurte à de nombreux obstacles. L'un de ceux dont la survivance sera, à n'en pas douter, la plus durable, est celui de la variabilité des compréhensions du sens d'un même mot. Contrairement à ce qui existe dans les langues à idéogrammes où cette variabilité est inhérente à la langue elle-même, dans le cas des langues anglaise ou française elle nait essentiellement de l'absence de rigueur des utilisateurs, que ce soit dans la compréhension du mot, ce qui serait un moindre mal mais aussi -et ceci est très grave- dans l'emploi même du mot (la compréhension devenant dans ce cas totalement impossible).

Contrairement à ce que l'on pourrait naïvement imaginer, le monde de la Biologie ne faillit pas à la règle générale de confusion en ce qui concerne la nomenclature des éléments constitutifs des structures tertiaires des protéines. Une telle situation est due en premier lieu au souci de certains d'induire sans nécessité un mot nouveau là où un autre prévalait antérieurement, ce mot nouveau étant généralement un mot trivial tour à tour imagé, poétique ou exotique, utilisé dans un sens particulier arbitrairement défini. Les approximations de traduction d'une langue à l'autre participent d'autre part largement à cet imbroglio.

Le résultat est qu'un même mot désigne plusieurs structures et qu'une même structure est désignée par plusieurs mots. Sans avoir un quelconque espoir de démêler cet écheveau, je voudrai rappeler quels sont les termes généralement utilisés par les auteurs, quelques uns de leurs sens et préciser lesquels j'ai personnellement choisis pour m'exprimer.

B - Les termes désignant les structures tertiaires des protéines dans la littérature :

1/ La partie

C'est par définition la "portion d'un tout". Si ce tout comporte deux "parties" on parle alors de"moitiés".

Ces deux mots évoquent une notion de partage et dans le cas du mot "moitié" de partage en deux parties égales. En fait les structures résultant de partage ont été nommées par les biochimistes"morceaux", "fragments" ou "domaines" (voir plus loin pour ce dernier mot) et l'usage des mots "partie" et "moitié" a été réservé à une notion plus statique, descriptive puisqu'ils ont servi à qualifier des structures localisées visuellement sur des modèles tridimentionnels de protéines.

Signalons au passage quelques cas d'utilisation de ces mots : ceux de la trypsine (298), de l'élastase (299), de la lactate déshydrogénase (300), de la thermolysine (301), de la subtilisine BPN' (302), du cytochrome c_2 (303), de l'anhydrase carbonique (304) etc.

2/ L'unité repliée

Cette expression a été simultanément employée avec les termes précédents pour définir à partir de l'examen d'un modèle tridimensionnel et/ou d'une carte des liaisons hydrogènes, une partie de la molécule présentant un repliement compact. Cette dénomination ne tient pas compte du mode de repliement de la molécule et est donc différente du domaine "unité de repliement" qui sera évoqué plus loin.

Citons pour mémoire le cas de la chymotrypsine (305) pour qui une telle nomenclature avait été utilisée.

3/ La région

Si on se fie à la définition du dictionnaire (306) la région est une "étendue (...) qui doit son unité à des causes physiques", un "espace déterminé de la surface (...). En anglais la notion de surface apparait également dans la définition de ce mot (307).

Pour les biologistes, la région devient volontiers un espace tridimentionnel. Ceci apparait clairement exprimé par Wetlaufer (308) qui la définit comme "la section de chaîne polypeptidique qui peut être contenue dans un volume compact" Deux observations doivent être faites :

a) la notion est purement visuelle -il faut posséder et regarder un modèle tridimentionnel pour définir une région protéique
b) la notion est fondée sur une définition subjective : celle de"volume compact" qui n'est pas en elle-même très précise.

L'imprécision de la définition du mot Région a conduit les auteurs à ajouter des adjectifs qualificatifs pour préciser leur pensée. Wetlaufer quant à lui distingue les régions continues des régions discontinues. Une région discontinue est une région qui possède plus de deux points terminaux, c'est à dire plus de deux points ou la chaîne polypeptidique traverse l'enveloppe imaginaire qui délimite son "volume compact". Une région continue au contraire ne possède que deux points terminaux. Pour Wetlaufer la formation des régions compactes est la conséquences du repliement rapide indépendant de la chaîne polypeptidique à partir de centres de nucléation, selon la théorie de Levinthal (309). Cette terminologie ne connut pas de succès parmi les biologistes qui, tout en citant volontiers Wetlaufer, préfèrent l'emploi du mot "domaine" à celui de région (voir plus loin).

4/ Le noyau

Selon la définition du dictionnaire le noyau est la "partie centrale d'un objet qui est d'une densité différente de celle de la masse"(306). Là encore les biochimistes se sont distingués en attribuant au mot une signification élargie, d'abord en éliminant la notion de densité et en ne gardant que celle de "partie centrale". Ainsi parle t-on des noyaux hydrophobes de la chymotrypsine (305),de la papaïne (310), de la subtilisine (302) etc.. La notion de centre elle-même a plus ou moins disparu puisque le terme s'applique souvent à la fraction d'une protéine native qui ne subit pas de dégradation lorsque cette dernière est soumise à l'action d'une protéase, que cette fraction soit au centre de la molécule ou bien excentrée. C'est ainsi que le mot noyau est employé pour désigner la partie cytochromique du flavocytochrome b_2 qui résiste à l'action des protéases (122) et qui est localisée en fait à la périphérie d'un centre tétramérique constitué par la partie flavodéshydrogénase (voir discussion plus loin). Le terme est aussi employé pour désigner une partie de la sulfite oxydase (311), du cytochrome b_5 (312) du represseur Lac (313). Dans ce dernier cas cependant il faut signaler que le "noyau" protéolytique demeure tétramérique comme l'enzyme natif et constitue donc à ce titre d'une certaine façon, le centre de la molécule.

5/ Le globule

Un globule est un "très petit corps sphérique" (306). Selon Goldberg (314) les globules constituent les parties d'une protéine qui sont essentielles à la complémentation. Deux notions supplémentaires sont cependant introduites

par cet auteur : la notion de repliement de telles structures à partir de centres de nucléation autonomes et la notion de susceptibilité protéolytique de la chaîne polypeptidique interglobulaire. Ces différentes notions seront reprises ensemble ou isolément par de nombreux auteurs. De nouvelles seront ajoutées. Je donnerai ici quelques exemples de différents sens du mot :

a) le globule "protéolytique"

C'est un fragment d'une protéine qui résulte d'une protéolyse ménagée de celle-ci et résiste à une protéolyse ultérieure. Ce sens est très voisin de celui évoqué pour le noyau protéolytique. L'emploi de l'un ou de l'autre terme n'est pas totalement indifférent , le terme "noyau semblant plutôt réservé à définir le résultat d'une protéolyse drastique, la notion de "drastique" étant sujette elle-même,j'en conviens,à interprétation. Nous verrons dans le cas du flavocytochrome b_2 l'illustration de ces nuances (voir p. 52). Dans la littérature les globules protéolytiques fleurissent. Ainsi en décrit-ton 6 dans la xanthine oxydase (315).

b) le globule "cristallographique"

C'est l'appellation qui me semble la plus juste, la vision d'un modèle permettant d'évaluer la forme réelle d'une quelconque partie d'une protéine Des globules de ce type ont été décrits pour la phosphoglycérate kinase (316), le lysozyme (317), etc. Selon Philipps (317), 40 résidus suffisent à former une unité globulaire.

c) le globule "unité" de repliement.

Pour Ptitsyn et Finkelstein (318) un globule est le résultat normal d'un repliement statistique. Sa taille est de 100 résidus.

6/ Le domaine

"Le domaine est une région délimitée sur une courbe, une surface ou dans l'espace"(306). Le champ d'application d'une telle définition est suffisamment large pour que de multiples significations de ce mot soient apparues dans la littérature au fil des ans. Si effectivement le mot "domaine" est utilisé quelquefois pour désigner un fragment linéaire d'une chaîne polypeptidique ou une surface de contact, un certain concensus existe néanmoins pour donner à ce mot une dimension d'espace tridimensionnel. La confusion n'en demeure pas moins grande puisque de nombreux auteurs ont utilisé ce mot avec un sens particulier lié soit à la cause supposée de formation de la structure qu'il définit,

soit à la méthode mise en oeuvre pour la mettre en évidence, soit à ses propriétés. Ainsi parle t'on volontiers de domaine génétique, protéolytique, cristallographique, fonctionnel , etc. Un certain nombre d'auteurs ont déjà évoqué les différentes définitions du mot "domaine"(citons par exemple Kirschner et Bisswanger (319) ou Rossmann et Argos (320). Je voudrais rappeler succintement ici les acceptions de ce mot les plus couramment utilisées, en signalant toutefois que de telles acceptions sont souvent également utilisées pour d'autres mots (voir par exemple le mot GLOBULE).

a) *le domaine "unité de séquence"*

Selon Rossmann et Argos (320) le mot "domaine" a été probablement utilisé pour la première fois en 1966 pour "décrire la répétition de séquences homologues dans les chaînes légères et lourdes d'une molécule d'immunoglobuline (321)

b) *le domaine "génétique"*

Cette appellation est en fait uniquement liée aux méthodes mises en oeuvre pour tenter de déceler l'existence de tels "domaines", méthodes qui sont de type génétique : complémentation, étude de la localisation de mutations, création de mutation non sens, etc. Ces méthodes, qui ne nécessitent pas a priori l'isolement de la protéine, constituent une première approche, indirecte, de l'étude de l'organisation structurale de celle-ci. Ainsi qu'il a déjà été noté (319) une réponse claire ne peut cependant être apportée par ce type de méthodes que si les différents domaines de la protéine considérée sont réellement fonctionnellement et structuralement indépendants. Sans entrer dans le détail, rappelons que des résultats positifs ont été obtenus pour des enzymes tels que la tryptophane synthetase de Neurospora crassa (ref dans 319 et 322) ou de Saccharomyces cerevisiae (ref dans 319) ou le composant II du complexe anthranilate synthase : phosphoribosyl-anthranilate transférase (323). Pour ces enzymes bifontionnels la mise en évidence du regroupement, dans une même région du gène, d'un certain nombre de mutations ayant pour conséquence la perte phénotypique d'une activité donnée, sans altération de l'activité complémentaire, permit de conclure que les deux activités étaient portées par des régions autonomes de la protéine. De la même façon l'indépendance des deux domaines de l'aspartokinase I homosérine déshydrogénase I, décelée par d'autres méthodes (324 ,325) fut confirmée par des expériences de complémentation et l'utilisation de mutants faux sens, aucun de ces derniers ne supprimant à la fois les deux activités de l'enzyme (326). D'autres exemples d'utilisation de ces méthodes sont décrites dans (319).

Une autre définition du domaine, également liée à la génétique, a été tentativement proposée après que fut mise en évidence l'existence de gènes morcelés. De tels gènes sont constitués de la succession d'exons, séquences codantes pour le produit du gène, qui peut être un acide ribonucléique ou une protéine (cf. revues ref. 327 et 328) et de séquences non codantes pour ce produit (introns) qui dans certains gènes mitochondriaux de la levure se sont avérées présenter une importante phase ouverte de lecture, laissant supposer qu'elles pouvaient coder pour un autre produit (329,330). L'hypothèse fut émise (331, 332) que les exons de gènes de structures de protéines codaient pour des domaines distincts de cette protéine. La principale critique que l'on puisse faire à une telle hypothèse est que de nombreux exons sont trop courts (328,333) pour coder pour un domaine stable dont la taille minimum est fixée par les auteurs a au moins 40 résidus (317,334). Un second argument est que dans certains cas un domaine défini par un autre critère s'avère être codé par deux exons différents (335,336).

c) *le domaine "protéolytique"*

Le domaine "protéolytique" peut être défini comme la partie d'une chaîne polypeptidique obtenue par protéolyse ménagée de la chaîne entière et résistant à une protéolyse ultérieure. Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, une telle définition a été également utilisée pour les mots "globule" ou "noyau". C'est néanmoins le mot "domaine" qui semble jouir actuellement de la préférence des chercheurs pour décrire de telles structures. C'est semble t-il Edelman, (337,338) qui utilisa le premier ce mot pour définir les fragments des immunoglobulines que Porter (339), avait obtenus par protéolyse. Depuis,des domaines "protéolytiques" ont été décrits pour de très nombreux enzymes. Citons quasiment au hasard la sulfite oxydase (340,341), le facteur d'élongation G (342) le represseur du phage λ (343), la fibronectine (344) etc.

d) *le domaine : structure protéique résultant d'un repliement indépendant :*

C'est Levinthal (309) qui introduisit le premier la notion de contrôle cinétique dans le repliement des protéines, s'opposant ainsi à la théorie bien établie du contrôle thermodynamique (voir par exemple la revue de Yon (334)). L'idée que des centres de nucléation pouvaient être à l'origine de "régions" indépendantes et compactes de la molécule protéique finale fut développpée par Wetlaufer et Ristow (308, 345) (mécanisme de nucléation-propagation). Le nom de région introduit par Wetlaufer ne fut cependant pas universellement admis et de nombreux auteurs reprirent ses hypothèses ou en émirent d'autres en utilisant le terme de "domaine". Ainsi est-ce le cas pour Schulz (346) dont le classement hiérarchique des différents degrés d'organisation des structures

protéiques tend à définir le domaine comme le repliement de structures secondaires ou super secondaires. Ainsi est-ce également le cas pour Karplus et Weaver qui firent des "microdomaines" les unités de diffusion de leur modèle de diffusion-collision (347). Pour Levitt et Chothia (348) il semble néanmoins plus clair de réserver le mot "domaine" à de larges entités "qui seraient stables si la chaîne polypeptidique les reliant au reste de la protéine devait être coupée Une étude des processus de repliement (ou de dépliement de tels domaines a été effectuée sur de nombreuses protéines (voir par exemple la revue de Baldwin (349) ou les cas particuliers de la serum albumine bovine (350), du lysozyme du phage T_4 (351), de l'élastase (352) etc.).

e) *le domaine cristallographique :*

Le développement de l'utilisation de la technique de la diffraction des rayons X pour l'étude des protéines a permis aux chercheurs d'accéder directement à la connaissance de leurs structures tridimentionnelles qu'ils ont cherché à décrire selon des critères subjectifs ou objectifs.

α) méthode visuelle "subjective"

Le simple examen des modèles a permis la mise en évidence d'enroulements compacts (...) de la chaîne polypeptidique, ayant une frontière simple entre eux"(353). De telles structures avaient été nommées "régions" ou "globules" auparavant. Cette ancienne terminologie fut récusée par Rossmann et Liljas (354) et le mot "domaine" devait s'imposer. Ainsi Monaco et al, décrivant l'état de repliement des chaînes catalytiques de l'aspartate carbamoyltransferase discernent-ils un domaine polaire et un domaine équatorial (355).Il faut noter que ce domaine polaire est constitué par des parties de la chaîne polypeptidique non continues dans la séquence (région "discontinue" selon Wetlaufer (308). De tels domaines "cristallographiques" ont ainsi été décrits dans de nombreuses protéines telles que le cytochrome c_3 (356), la phosphoglycerate kinase (357), l'adenyl kinase (358), la rhodanese (359), l'élastase (360) etc. Une classification très documentée de ces domaines, fondée sur leur contenu en structures secondaires et leurs propriétés a été récemment effectuée par Rossmann et Argos (320)

β) méthodes objectives

Ces méthodes se fondent sur la connaissance des coordonnées cartésiennes des atomes C_α d'une chaîne polypeptidique. A partir de ces données peuvent être définies par le calcul, conformément à un critère préalablement choisi, les parties d'une chaîne polypeptidique formant un "domaine". Un tel domaine a été défini par Crippen (353) comme l'ensemble des segments de la chaîne interagissant fortement entre eux et n'interagissant pas ou peu avec d'autres segments ou par Wodak et Janin (361) comme les groupes de résidus acides aminés

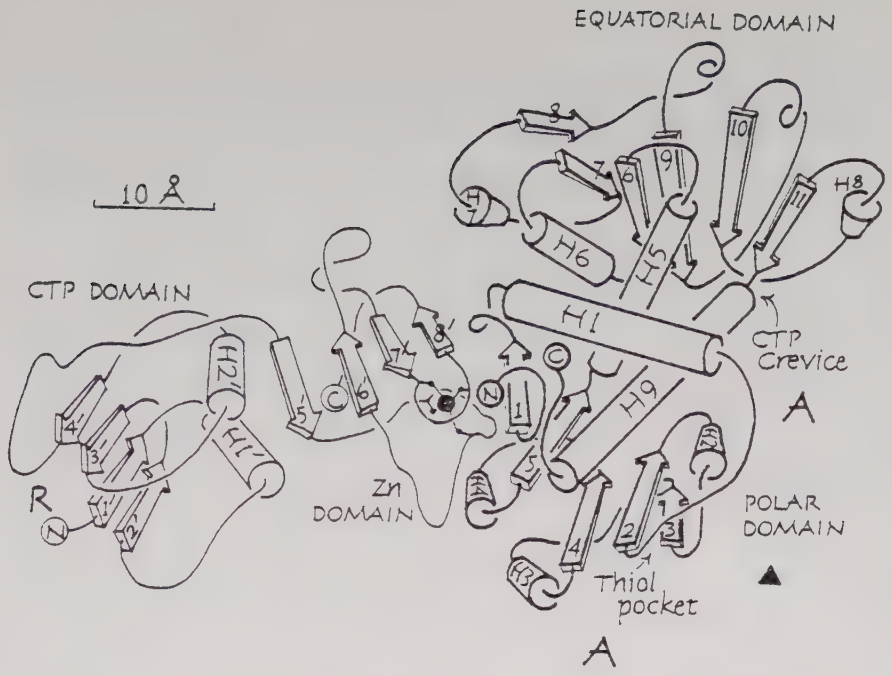

Figure 1 : Les domaines structuraux de l'aspartate transcarbamylase selon Monaco et al. (355).

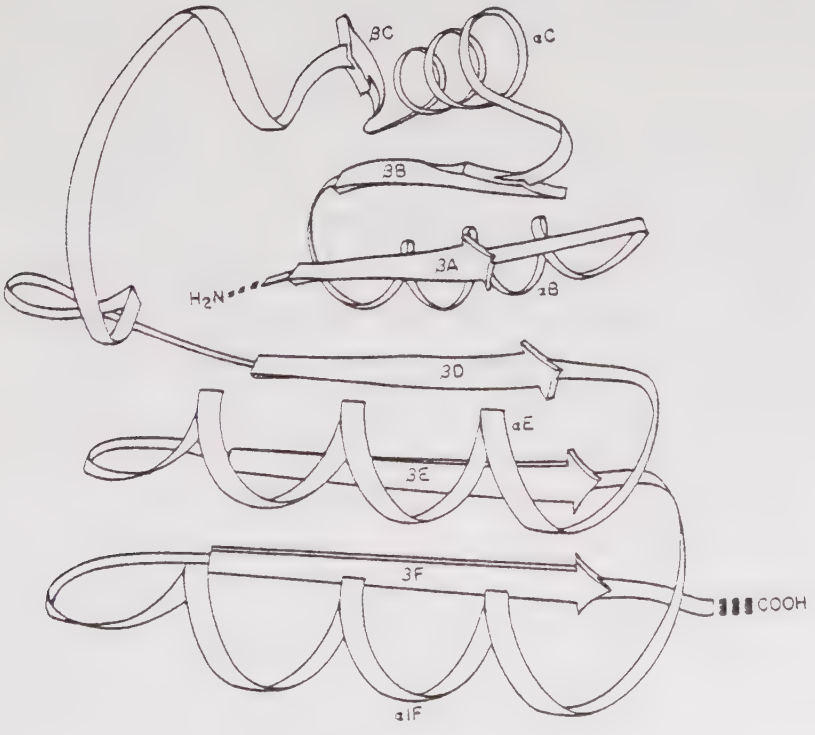

Figure 2 : Représentation schématique de la structure du domaine de fixation du coenzyme nucléotidique chez les déshydrogénases selon Ohlsson et al (367).

présentant un rapport suface/volume minimum et une surface de contact minimum avec le reste de la molécule. D'autres méthodes de calcul ont été proposées par Rossmann et Liljas (354) et Rose (362).

f) *le domaine "unité" structurale douée d'une propriété fonctionnelle simple"*

Dans les définitions que nous venons d'évoquer, le domaine est caractérisé selon la méthode utilisée pour la mise en évidence de son "unité structurale". Un certain nombre d'auteurs ont plutôt défini le domaine comme une entité structurale douée d'une propriété fonctionnelle simple, sans mettre en avant la méthode initiale ayant permi de l'isoler. Une des conséquences premières d'une telle définition est qu'elle s'applique aussi bien à des "espèces" bidimentionnelles que tridimentionnelles. Sans entrer dans le détail, rappelons que les domaines d'interactions entre deux protéines (par exemple363-365) sont considérés plus volontiers comme des surfaces de contact. Si l'on s'en tient aux entités tridimentionnelles, deux notions sont particulièrement utilisées : celle de domaine de fixation d'un cofacteur et celle de domaine catalytique.

α) le domaine de fixation d'un cofacteur

Ces domaines sont parfois définis à partir d'expériences de protéolyse (341) Les résultats les plus spectaculaires dérivent néanmoins d'études tridimentionnelles. Ainsi Monaco et al (355) distinguent-ils dans les chaînes régulatrices de l'aspartate carbamoyl transférase un domaine de fixation du CTP et un domaine de fixation du zinc (Fig. 1) et Haser (356) dans le cytochrome c_3 deux domaines portant chacun un hème.

L'exemple le plus connu de domaine "site de fixation d'un cofacteur" est celui du domaine de fixation d'un nucléotide, appelé souvent "Rossman fold". La comparaison des structures de plusieurs déshydrogénases (la lactate déshydrogénase, la malate déshydrogénase soluble, l'alcool déshydrogénase du foie et la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase) a permis en effet de montrer que ce domaine avait la même conformation pour chacune de ces déshydrogénases. Sa structure consiste en 6 brins β parallèles reliés entre eux par 4 hélices α (voir figure 2) (366-370). Un repliement de ce type est également présent dans d'autres protéines comme les flavodoxines (366). Initialement défini par le terme de 'structure super secondaire' (366) le "repliement de type Rossmann" fut ensuite baptisé 'domaine'. Une certaine imprécision dans le recouvrement exact de ce dernier terme est apparue dans (370) où le mot domaine a été employé pour définir à la fois la structure fixant un mononucléotide et celle fixant un dinucléotide. L'utilisation du mot "domaine" est désormais réservée à la structure fixant un dinucléotide, celle fixant un mononucléotide (3 brins β, 2 hélices α) étant nommée 'unité' (368).

β) le domaine : structure portant une activité enzymatique

Leur mise en évidence fait appel aux différentes méthodes vues précédemment. Ainsi un ou plusieurs domaines fonctionnels de la sulfite oxydase (340,341) de l'aspartokinase homosérine déshydrogénase (325), de la DNA polymérase (371-372) ont ils été découverts grâce à des expériences de protéolyse. Dans le cas du domaine portant l'activité aspartokinase de l'aspartokinase homosérine déshydrogénase c'est une méthode génétique (mutation non sens) qui a été utilisée (325). Les domaines catalytiques des déshydrogénases quant à eux sont définis à partir des structures tridimensionnelles des protéines correspondantes (369).

Parfois même,comme dans le cas de la sulfite oxydase, les domaines fonctionnels correspondent en fait aux domaines fixant un cofacteur définis précédemment (340-341).

7/ Autres termes définissant des structures tertiaires compactes

Les termes que je viens d'évoquer sont ceux qui sont le plus souvent employés pour définir les structures tertiaires des protéines. D'autres mots ont cependant été épisodiquement employés par différents auteurs en particulier pour décrire les modèles cristallographiques. Ainsi parle-t-on des ailes du lyzozyme (317) ou des lobes des protéases acides (373), de la papaïne (374), de l'hexokinase (375) etc. Ainsi que le souligne Crippen (353) ces termes recouvrent la notion plus générale et plus actuelle de "domaine cristallographique".

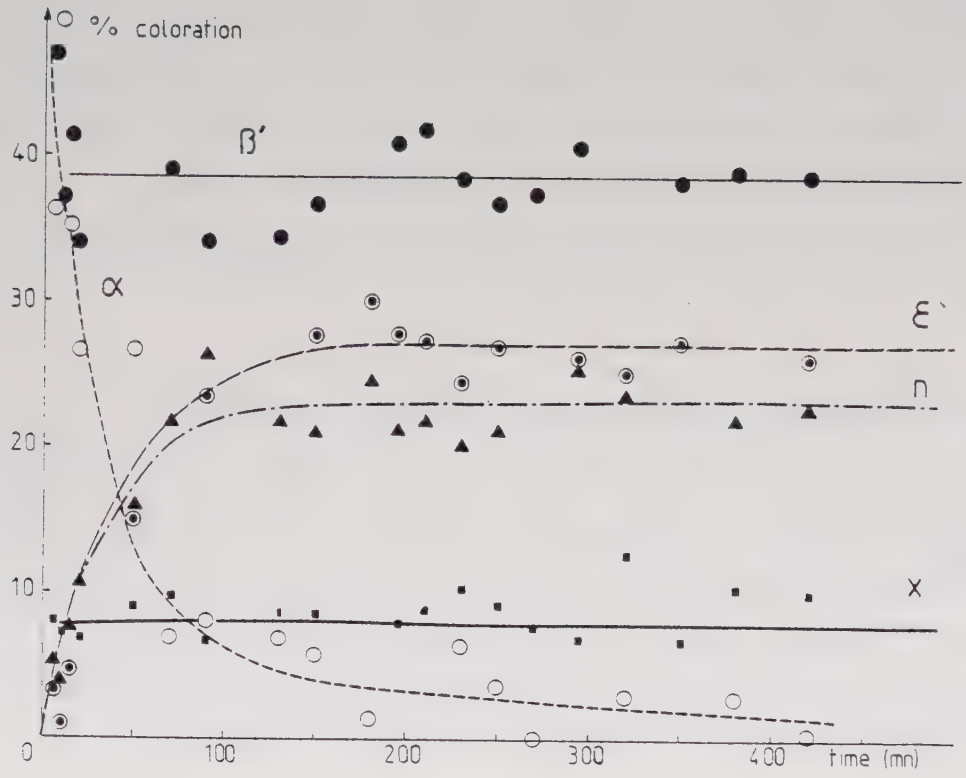

Figure 3 : Evolution des espèces polypeptidiques au cours de la trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2 selon Gervais et al (239).

II - CAS DU FLAVOCYTOCHROME b_2

Afin de ne pas ajouter à la confusion existante évoquée précédemment, j'ai choisi, pour décrire nos résultats un certain nombre de termes utilisés par d'autres pour rendre compte de résultats obtenus à partir de la même technique. Néanmoins, pour que les mots employés dans le cadre de ce mémoire soient clairement définis je serai amené à préciser au cours de cette discussion le sens exact que je leur affecte.

1 - Globules et ponts polypeptidiques

Le premier but de ce travail était de mettre en évidence un certain nombre de structure tertiaires du flavocytochrome b_2 et de définir les conditions optimum de leur obtention afin de pouvoir les étudier ensemble ou isolément.

Dans l'article I, nous avons montré que la chaîne polypeptidique du H-flavocytochrome b_2, soumise à l'action de la trypsine est clivée de façon préférentielle en deux zones internes "a" et "cd" hypersensibles à l'action de cette protéase (nous verrons chapitre III, article IV, qu'une coupure intervient également à l'extrémité N-terminale de la chaîne).

Pour le S-flavocytochrome b_2, la situation est tout à fait semblable. Rappelons que cet enzyme peut être préparé sous deux formes : la première est dite "physiologique" ou "intacte" : son protomère est constitué d'une chaîne polypeptidique unique ; la seconde, dite "clivée" ou "cristallisée" résulte d'une coupure protéolytique artéfactuelle, localisée aux 2/3 de la chaîne, qui est effectuée par les protéases endogènes de la levure, ainsi qu'il est fréquent d'observer lors des préparations d'autres enzymes, en particulier chez la levure (voir à cet égard la revue de Pringle (376)). La zone "a" de la forme physiologique est ainsi coupée de façon prioritaire par la trypsine (Labeyrie et Tegoni, communication personnelle). La zone "cd" de la forme "clivée", ainsi que l'avaient montré Naslin et al et comme nous l'avons confirmé dans l'article II est également hypersensible à l'action de cette protéase. Enfin une coupure N-terminale de la chaîne (perte de 7 résidus d'acides aminés) fut également mise en évidence (199) lors de la préparation du noyau cytochromique b_2 trypsique (122).

Au delà de la similitude des schémas de dégradation de ces deux flavocytochrome b_2 extraits de levures différentes pour la seule trypsine (qui coupe du côté C terminal d'un résidu lysine ou arginine)(377) deux arguments suggèrent que leurs chaînes polypeptidiques respectives sont repliées en trois entités

comptactes liées entre elles par deux ponts polypeptidiques de structure moins compacte : a) les mêmes zones sont hypersensibles à des protéases de spécificité différentes, b) les fragments formés lors de la coupure résistent à une protéolyse ultérieure.

a) les mêmes zones sont hypersensibles à des protéases de spécificités différentes :

i) cas du S-flavocytochrome b_2

La zone "a" du S-flavocytochrome b_2 "physiologique" est coupée de façon sélective par :

- la chymotrypsine (215) qui est spécifique d'une liaison peptidique adjacente au groupement carbonyl d'un résidu aromatique (tryptophan, tyrosine, phénylalanine)(305)
- la subtilisine (215) de spécificité plus large (aromatiques et apolaires (378)
- la protéase de Staphylococcus aureus V8 (255) qui coupe du côté C-terminal d'un résidu aspartique ou glutamique (379, 380)
- les protéases endogènes de la levure. Ainsi que le suggère l'inhibition de cette protéolyse par le PMSF (fluorure de phényl methyl sulfonyl)(168), il pourrait en fait s'agir ici de la protéinase B (381) bien connue par ailleurs pour son pouvoir activant de la chitine synthetase (382) ou inactivant de la tryptophane synthase (383) protéase dont la spécificité n'est pas claire (384).

ii) cas du H-flavocytochrome b_2

La zone "a" du H-flavocytochrome b_2 est coupée de façon sélective par :

- la thermolysine (250) spécifique d'une liaison peptidique adjacente au groupement aminoterminal d'un résidu hydrophobe à chaîne latérale encombrante (leucine, isoleucine, phenylalanine, methionine, alanine, valine)(385).
- l'élastase (250) de spécificité complémentaire à celle de la trypsine et de la chymotrypsine, c'est à dire coupant du côté carboxy terminal d'une alanine, leucine, valine, glycine, sérine (299).
- la protéinase K (250) qui coupe du côté carboxyterminal des aromatiques ou des résidus hydrophobes (384).
- la pepsine (250) de large spécificité (386)
- la clostripaïne (voir article IV), spécifique d'une liaison peptidique adjacente au groupement carboxyl d'un résidu arginine (387).

La zone "cd" quant à elle est coupée par :

- les protéases endogènes de la levure Hansenula anomala, ainsi qu'en témoigne la formation du fragment P_1 déjà nommé (179)

- la protéase de S.aureus V8 (voir Article V).

Enfin les deux zones "a" et "cd" semblent coupées par la chymopapaïne (Gervais, M., résultats non publiés) de spécificité voisine de celle de la papaïne (384).

En conclusion : en dépit de différences notables observées au niveau de leur composition globale en acides aminés (161) et (Baudras, Lederer, résultats non publiés), les deux flavocytochrome b_2 présentent les deux mêmes zones d'hypersensitivité protéolytique ("a" et "cd") non seulement vis à vis de la trypsine mais également de plusieurs autres protéases de spécificité différentes.

b) les fragments formés lors de la coupure trypsique résistent à une protéolyse ultérieure :

La résistance d'un fragment est une notion toute relative, qu'il est difficile de quantifier et la question se pose de savoir par rapport à quoi on peut l'estimer. L'un des moyens pourrait consister à comparer ses propres résultats, exprimés en terme de vitesse de dégradation ainsi que nous l'avons fait dans l' Article II , avec des résultats de la littérature relatifs à d'autres protéines. Une telle solution ne me semble pas susceptible de répondre à la question posée. Aussi, lorsque l'on veut obtenir des renseignements sur l'organisation architecturale d'une molécule, un témoin interne qui consiste en la comparaison des vitesses de coupure des zones dites "sensibles" et de dégradation des fragments formés me semble être le meilleur témoin. Une différence de plusieurs ordres de grandeur a pu être ainsi observée entre les vitesses de ces deux processus, aussi bien dans le cas du S-flavocytochrome b_2 (voir article II) que dans celui du H-flavocytochrome b_2 (207, 239). De façon concrète ces différences de vitesses se traduisent sur les graphes (concentration d'une espèce i) = f(t) par des pseudo plateaux pour les espèces stables (voir article II pour le S-flavocytochrome b_2 et figure pour l'enzyme H).

L'argument de "résistance" que nous venons de formuler n'est acceptable que si les fragments non dégradés possèdent néanmoins sur leur chaîne polypeptidique des sites correspondant à la spécificité de la protéase utilisée. Dans le cas de la trypsine ces sites sont des résidus lysine et arginine.

En ce qui concerne les fragments ε et β' du flavocytochrome b_2, leur dégradation ultérieure dans des conditions plus drastiques, telles celles utilisées pour la préparation du noyau cytochromique b_2 trypsique (122, 167), montre bien que leur chaîne comporte de tels résidus. De fait, les morceaux de séquences

connus des extrémités N-terminales de β_S (265) et β'_H trypsique (voir article IV, figure 7) confirment la présence de résidus arginine et lysine. Dans ce dernier fragment ces résidus occupent au moins les positions 19, 25, 35, 39 et 40.
Pour les fragments n, ou noyaux cytochromique b_2, la situation est semblable ainsi qu'il ressort de la séquence de celui de l'enzyme S (186) et de l'analyse en acides aminés (Lederer et Baudras, résultats non publiés) de celui de l'enzyme H.

En raison des deux arguments a) et b) présentés ci-dessus, je crois raisonnable de penser que les fragments n, ε , β' sont repliés, dans le flavocytochrome b_2 natif, dans une conformation compacte. A ce titre, je les ai nommés GLOBULES, dans le sens protéolytique du terme défini précédemment.

Ce terme,qui ne définit que l' aspect compact du repliement de la chaîne polypeptidique ne préjuge en rien a priori du caractère "continu" ou "discontinu" de ce repliement tel qu'il a été défini par Wetlaufer (308). De même aucune extrapolation ne peut être faite a priori sur la possibilité de chacun de ces trois fragments d'être stable à l'état isolé.

En fait, comme nous l'avons vu dans les articles I et II, il y a,après coupure, partition spontanée du globule n et de l'entité biglobulaire $\varepsilon\beta'$. On peut par conséquent a postériori préciser que n est une région "continue" selon (308). De plus il est stable à l'état isolé. C'est donc un globule dans tous les sens du terme.

Reste ε et β' dont la séparation nécessite (voir article III) un agent dissociant. Cette particularité indique uniquement que les forces d'interaction entre ces deux globules sont fortes et n'infirme ni ne confirme la possibilité d'intrication du repliement de leurs chaînes polypeptidiques.Des expériences faites sur le S-flavocytochrome b_2 suggèrent cependant que ε et β' sont également des régions continues puisqu'il est possible de retrouver, en présence de flavine, une activité lactate → ferricyanure réductasique immédiatement après mélange de fragments α_S et β_S préalablement isolés (Risler, Y, et Labeyrie, F., résultats non publiés).

En ce qui concerne la stabilité des fragments ε ou β' en tampon usuel, toutes les informations ne sont pas encore disponibles. β_S est soluble (221) mais β'_H ne l'est pas (voir article III) ; quant au fragment ε , je ne l'ai pas encore préparé à l'état isolé.

nota : cas particulier du globule "n"

Dans toutes les publications antérieures à ce travail, le globule "n" qui avait été isolé et caractérisé (122,135, 158, 167,176,186) avait été nommé "noyau cytochromique b_2" en raison de sa résistance vis à vis d'une protéolyse drastique. Afin de ne pas compliquer inutilement une nomenclature déjà souvent hermétique aux utilisateurs non familiarisés, j'ai conservé cette appellation dans ce mémoire, le terme de "noyau" dans ce cas particulier, ne signifiant à mon esprit,rien d'autre que celui de globule tel qu'il vient d'être défini.

2 - Séparation des DOMAINES fonctionnels

Pour le H- comme le S-flavocytochrome b_2, après clivage des deux régions "a" et "cd", deux entités moléculaires se séparent spontanément en tampon usuel. En raison de cette partition spontanée nous définissons ces structures comme étant des DOMAINES.

Le premier de ces domaines, formé des fragments ε et β' (enzyme H) ou X et β' (enzyme S) porte le FMN et présente comme l'enzyme natif une structure quaternaire tétramérique. C'est une flavoprotéine.

Le second domaine formé du seul globule n porte l'hème : c'est une hémoprotéine. Les deux domaines définis protéolytiquement portent donc chacun un coenzyme.

Dans le cas du H-flavocytochrome b_2 nous avons montré que le domaine flavinique εβ' conserve la capacité d'oxyder le L(+)lactate. C'est donc une lactate déshydrogénase. Il a été récemment montré d'autre part (262) que le globule cytochromique b_2 était capable de transférer les électrons au cytochrome c : c'est donc un cytochrome fonctionnel. En raison de ces observations nous dirons donc que la molécule du H-flavocytochrome b_2 est constituée de deux domaines fonctionnels : l'un (n) monoglobulaire, l'autre (εβ') biglobulaire.

En ce qui concerne le S-flavocytochrome b_2, nous ne pouvons affirmer (voir article II) que le domaine Xβ', qui se sépare spontanément du domaine hémique après coupure trypsique, et qui conserve le FMN fixé est effectivement doué d'une activité lactate → ferricyanure réductasique, en raison de la contamination des préparations par des fragments portant de l'hème fixé. Par analogie avec le H-flavocytochrome b_2 il est cependant raisonnable de penser que ce domaine est également un domaine fonctionnel. L'obtention d'une flavodéshydrogénase chez laquelle le pont polypeptidique "a" reliant les deux fragments X et β' ne serait pas coupé pourrait sans doute permettre de trancher

ce problème. Malheureusement la technique (emploi de la protéase de S.aureus V8) qui a permis de réaliser une préparation de ce type chez le H-flavocytochrome b_2 (voir article V) n'est pas applicable pour le S-flavocytochrome b_2 en raison de la présence d'un résidu glutamique dans cette zone (265).

Quoiqu'il en soit, et avec la petite restriction qui concerne le S-flavocytochrome b_2 que je viens d'évoquer, la définition des deux domaines que nous avons séparés repose donc sur trois fondements : protéolyse, propriété de fixation d'un coenzyme et fonction. Il est probable, de par la partition spontanée de ces domaines après coupure de la zone "cd", que l'examen de la structure tridimentionnelle du flavocytochrome b_2, structure dont la détermination est en cours (212, 238), révèle une organisation spatiale de la chaine polypeptidique en deux domaines distincts. Nous verrons dans la discussion du chapitre II la signification évolutive probable d'une telle situation.

nota : cas des fragments α et β'

- Au moins dans un des articles contenus dans ce mémoire (article III) nous avons défini les fragments α et β' issus de la coupure trypsique du H-flavocytochrome b_2 comme des "domaines". Ce terme me semble aujourd'hui quelque peu ambigü. En effet,ainsi que nous le verrons chapitre II, α et β' ne se séparent pas spontanément après coupure de la zone "a" ; ils ne correspondent pas chacun à une structure de fixation d'un coenzyme ni, à fortiori, à des domaines fonctionnels. Les termes moins évocateurs de "fragments" ou de "parties" me semblent par conséquent mieux adaptés. Une situation voisine existe pour les fragments F_1 et F_2 de la sous-unité β_2 de la tryptophane synthétase qui ont également été nommés : "domaines" (388).

- Dans le modèle présenté dans l'article I, nous avons assigné à ε_H la responsabilité des interactions interprotomériques. Cette hypothèse était en partie supportée par le fait que α_s pouvait former des dimères tandis que β_s semblait essentiellement monomérique (221). A la lumière des résultats présentés dans l'article III (α_H monomérique, β'_H polymérique) nous serons en fait amenés à attribuer à β'_H la responsabilité de telles interactions.

III - Cas général de l'action -in vitro- des protéases sur les enzymes multifonctionnels :

Les études concernant l'action in vitro de diverses protéases sur des protéines repliées dans leur conformation native ont principalement été réalisées à l'origine pour a) avoir des renseignements sur la conformation de ces protéines b) étudier les effets d'un certain nombre de clivages sur leur activité biologique (297).

Ainsi que nous venons de le voir l'étude de la protéolyse ménagée du flavocytochrome b_2 a largement permis d'aborder le premier de ces points en mettant en évidence une structure triglobulaire pour son protomère. De plus cette protéolyse ménagée s'est soldée par la séparation des deux entités fonctionnelles initialement covalemment associées au sein de l'édifice bifonctionnel . Une telle situation particulièrement favorable n'est cependant pas extrêmement courante et les études de protéolyse de protéines multifonctionnelles, très nombreuses ces dernières années ne donnèrent que très rarement des résultats aussi spectaculaires. Ces résultats peuvent en fait être regroupés selon les trois possibilités mentionnées par Hill (297) :

a) ou bien la protéine est coupée par un mécanisme de"tout ou rien"et aucun intermédiaire stable n'est décelable

b) ou bien, et c'est le cas le plus favorable mais également le plus rare, l'attaque protéolytique se limite à quelques ponts polypeptidiques particulièrement sensibles, les fragments formés consécutivement à ces coupures demeurant quant à eux résistants vis à vis d'une protéolyse ultérieure.

c) ou bien on a un mélange des deux cas précédents : une des parties demeurant stable, l'autre étant rapidement dégradée.

A ces trois cas, j'ajouterai volontiers un quatrième, le cas où la protéase n'a aucun effet sur la protéine considérée. Ce cas me parait tout à fait difficile à interpréter sans expérience complémentaire, les raisons d'une telle situation pouvant être multiples (concentration en protéase insuffisante, conditions de pH, de sels ou de force ionique inadéquates, absence d'activateur, spécificité de la protéase non présente sur la protéine que l'on veut protéolyser, structure compacte de type globulaire, etc.). Ainsi dans le cas particulier du flavocytochrome b_2, qui s'est avéré être un excellent substrat pour diverses protéases (voir plus haut), aucune protéolyse n'a cependant pu être observée avec une protéase telle que la thrombine (Gervais, résultats non publiés), la plasmine (250) ou la métalloprotéine de Bacillus polymyxa (250).

En ce qui concerne les modes de protéolyse mentionnés ci-dessus dans les paragraphes b) et c) je voudrais citer quatre cas qui me semblent exemplaires.

Les deux premiers concernent le mécanisme mixte (isolement d'une fonction et perte de l'autre). Ce mécanisme est assez répandu mais ces deux exemples sont devenus quasiment historiques. Les deux autres exemples figurent au même titre que le flavocytochrome b_2 au nombre restreint des situations les plus spectaculaires ou les deux domaines fonctionnels se trouvent séparés par la coupure protéolytique.

1/ *Cas ou seulement une des fonction est conservée :*

a) Cas de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

La glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase catalyse l'oxydation phosphorylative du glycéraldéhyde 3-P en 1.3 diphosphoglycérate. Sous l'action de la chymotrypsine l'activité phosphorylative est perdue, l'enzyme ne conservant que son activité oxydative (390).

b) Cas de l'aspartokinase homosérine déshydrogénase

Sous sa forme native, l'aspartokinase I homosérine déshydrogénase I de E.coli K12 est un tétramère de poids moléculaire 4 x 86 000. L'action ménagée de l'α chymotrypsine sur cet enzyme bifonctionnel provoque la dégradation d'environ 1/3 de la molécule. Le fragment restant, qui demeure stable vis à vis d'une protéolyse ultérieure (MW 2 x 55 000) conserve uniquement l'activité homosérine déshydrogénase, l'activité aspartokinase quant à elle étant perdue (325). Une situation de même type est observée dans le cas de l'aspartokinase II-homoserine déshydrogénase II (391).

2/ *Cas ou la protéolyse permet la séparation de plusieurs fonctions :*

a) DNA polymérase I de E.coli

La DNA polymérase de E.coli est formée d'une seule chaîne polypeptidique de poids moléculaire 109 000 (392). Soumise à l'action ménagée de la subtilisine, cette chaîne est clivée en deux fragments quasi complémentaire de poids moléculaire 35 000 et 75 000 (393,394) qui se dissocient spontanément après la coupure protéolytique (372). Le premier d'entre eux, situé à l'extrémité N-terminale de la chaîne (395) porte l'activité exonucléase 5' → 3' spécifique d'un ADN double brin ; le second porte à la fois l'activité polymérase et l'activité exonucléase 3' → 5' spécifique d'un ADN simple brin (372,396). Il faut noter que des protéolyses faites antérieurement en absence d'ADN n'avaient permis d'isoler que le grand fragment, l'autre étant perdu (371). Ceci est une illustration de la subjectivité de la notion de résistance d'une protéine vis à vis d'une protéase (voir discussion p. 51).

b) Cas de la sulfite oxidase de rat :

La sulfite oxidase de rat est un enzyme dimérique de poids moléculaire 2 x 57 000. L'action d'enzymes protéolytiques tels que la trypsine, la papaïne et la chymotrypsine se traduit par un clivage préférentiel en divers points

d'une zone particulièrement sensible s'étendant sur environ 30 résidus d'acides aminés (341). Le résultat de tels clivages est la séparation spontanée d'un domaine hémique qui est monomérique (PM 10 000) d'un domaine à molybdène dimérique (PM : 2 x 45 600) (340,341).

En conclusion :

Ces différents exemples, ainsi que ceux précédemment cités illustrent l'intérêt de l'utilisation de protéases par le biochimiste pour définir, non seulement la structure tertiaire de la protéine qu'il étudie, mais également le mode d'intégration à cette structure d'une ou plusieurs fonctions.

La mise en évidence des deux domaines fonctionnels du flavocytochrome b_2 de levure constitue à cet égard un résultat particulièrement éloquent. Ainsi qu'il a déjà été mentionné, les résultats d'une telle méthode ne sont cependant pas toujours aussi fructueux et il faut souligner que le cas du flavocytochrome b_2 s'est révélé être un cas très favorable.

Dans le chapitre suivant, nous verrons comment l'obtention de fragments protéolytiques a permis d'aborder le problème de la localisation du site flavinique.

C H A P I T R E I I

LOCALISATION DU SITE FLAVINIQUE DU H-FLAVOCYTOCHROME B_2

ARTICLE III : A FLAVIN MONONUCLEOTIDE BINDING SITE IN HANSENULA ANOMALA NICKED FLAVOCYTOCHROME B_2, REQUIRING THE ASSOCIATION OF TWO DOMAINS.

GERVAIS, M., LABEYRIE, F., RISLER, Y. & VERGNES, O. (1980) Eur. J. Biochem. 111, 17-31.

INTRODUCTION

Il existe un grand nombre de méthodes susceptibles de fournir des renseignements sur l'environnement immédiat d'un coenzyme flavinique dans une protéine. Ces méthodes peuvent impliquer une étude directe du coenzyme (en fluorescence par exemple (397) une modification de celui-ci (emploi d'analogues) (398) etc., le "hec plus ultra" en l'occurence étant la détermination de la structure tridimentionnelle de la protéine grâce à la technique de diffraction des rayons X. (399-404).

D'autres méthodes visent à situer d'une façon globale le site flavinique par rapport au reste de la molécule. L'obtention de fragments protéiques et l'étude de la possibilité de fixation du coenzyme sur l'un ou plusieurs d'entre eux est l'une de ces méthodes. C'est celle-ci que Ninio et al avaient choisie pour étudier le site flavinique du S-flavocytochrome b_2. Bien qu'a priori la démarche puisse ne pas sembler particulièrement originale, j'ai décidé de réinvestiguer sur le H-flavocytochrome b_2 ce problème de la localisation du site flavinique en effectuant une étude voisine dans l'esprit de celle faite précédemment sur le S-flavocytochrome b_2.

Deux raisons ont principalement guidé mon choix :

a) la suspicion que j'éprouvais lorsque j'entendais qualifier de propriété du flavocytochrome b_2 en général ce qui n'avait été montré que sur le S-flavocytochrome b_2 en particulier.

b) l'absence de données précises sur les altérations structurales subies aux extrémités d'α et de β lors de la coupure de l'enzyme S par les protéases de la levure Saccharomyces cerevisiae. Il était en effet envisageable qu'une partie jouant un rôle important dans la fixation de la flavine ait été perdue au cours de cette protéolyse. Par contre, à partir du H-flavocytochrome b_2, dont la chaîne protomérique n'avait pas subi de coupure au cours de la préparation, grâce à l'emploi contrôlé d'une protéase à stricte spécificité, on pouvait espérer obtenir des fragments de type α et β ne résultant que d'une coupure unique de la chaîne native dans la zone "a", sans perte de peptides.

En fait, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, nous disposions déjà d'un matériel dont nous aurions pu théoriquement tirer parti. Il s'agissait de la flavodéshydrogénase trypsique (FDH_T). Cette flavodéshydrogénase est formée des globules ε et β' (globules 2 et 3), le pont polypeptidique "a" les reliant dans l'enzyme natif ayant été coupé dès le début de la trypsinolyse, avant même que le pont "cd" reliant cette flavodéshydrogénase au noyau cytochromique n (globule 1) ne soit lui-même clivé. Il aurait donc été possible d'essayer de

séparer les deux fragments ε et β'' pour tester la capacité de chacun d'entre eux à fixer le coenzyme flavinique. Cette démarche n'a pas été choisie pour au moins cinq raisons : a) la faible activité de la forme $(\varepsilon\beta')_4$ (voir chapitre III) (au maximum 1/4 de celle de la forme $(\alpha\beta')_4$; b) la difficulté rencontrée dans certaines préparations pour la solubiliser dans les tampons usuels (207) ; c) le rendement relativement faible de son obtention (exceptionnellement 50 %) ; d) la possibilité de perte de peptides jouant un rôle critique dans la fixation de la flavine ; e) la nécessité de préparer de toute façon les fragments α_H et β'_H pour la poursuite de mon travail.

Aussi est ce sur la forme protéolysée $(\alpha\beta)_H$ que nous avons travaillé. Les conditions de préparation de cette forme ont été redéfinies de façon à ce que soit limitée la concentration en trypsine et que les temps de protéolyse soient fortement augmentés. Nous décrivons dans l'article III les modalités de cette préparation, la séparation des fragments α et β' formés, la mise en évidence des structures nécessaires à la conformation du site flavinique. Dans la discussion de ce chapitre, les résultats concernant le site de la flavine (ce chapitre) et ceux (chapitre I) concernant la séparation des fonctions sont interprétés en terme de fusion de gènes. En ce qui concerne la topologie du site flavinique nos résultats sont comparés aux données structurales actuellement connues concernant la structure des flavoprotéines et en particulier des sites flaviniques.

Eur. J. Biochem. *111*, 17–31 (1980)
© by FEBS 1980

A Flavin-Mononucleotide-Binding Site in *Hansenula anomala* Nicked Flavocytochrome b_2, Requiring the Association of Two Domains

Michel GERVAIS, Françoise LABEYRIE, Yanick RISLER, and Odile VERGNES

Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Received September 17, 1979)

Previous experiments in our laboratory with *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b_2 indicated that both fragments α and β of the enzyme isolated after cleavage by yeast proteases are required to form the flavin site.

More detailed experiments have now been carried out on the nicked *Hansenula anomala* enzyme obtained by tryptic cleavage. A method has been devised that gives a quantitative separation in 4 M urea of β, and α with its heme still bound. The characteristics of the various species: isolated α and β and mixed $\alpha + \beta$ were studied in 4 M urea and after elimination of this reagent by dialysis in the presence of FMN and 2-mercaptoethanol. Several methods, including heme spectroscopy, tryptophan fluorescence, sedimentation studies, and titration of bound flavin, were used. The results indicate that isolated α and β have a folded globular structure after renaturation. The flavin binding to the $\alpha + \beta$ mixture was important (50–100 %) with recovery of the flavodehydrogenase activity. In contrast, binding was not detectable (< 0.5 %, $K_d > 10$ mM) for isolated α and β. As far as mononucleotide binding is concerned, such a cooperative requirement for two folding domains has never before been reported in other enzymes.

The present results are discussed together with others obtained in our laboratory which demonstrate that, as deduced from their sensitivity to trypsin, the structure of *S. cerevisiae* and *H. anomala* flavocytochrome b_2 protomers is triglobular 'n-x-β' (n and x combined within α). The tetramer assembly, which remains intact as a nicked enzyme $(\alpha\beta)_4$ after the first trypsin cleavage, is broken down following a second cleavage of the chain into four cytochrome cores (n) and a functional T-flavodehydrogenase entity, a tetramer of the type $(x\beta)_4$.

Yeast flavocytochrome b_2 appears to be a typical example of a protein molecule folded into several globular domains (three in the present case). It was previously recognized as a complex enzyme since each protomer, although formed of a single polypeptide chain [1, 2] carried two different prosthetic groups, one protoheme and one flavin mononucleotide [3]. Its polyglobularity was revealed by its particular sensitivity to proteolytic cleavage of two zones in each polypeptide chain of the native tetramer [2, 4–6].

Such a pragmatic criterion has proved to be of great importance in revealing the presence of segments in the polypeptide backbone forming extruding flexible loops and connecting globular domains resistant to proteases, as shown by the bibliography of the last ten years (cf. a review by Kirschner and Bisswanger [7] and the proceedings of a meeting held in 1978 [8]). The accumulated data suggest that most of the proteins with long polypeptide chains are folded into two or more compact domains connected by protease-sensitive bonds.

How might such structures have evolved? Long chains might have been built by gene duplication, insertion or fusion from ancestral genes coding for globular proteins as building blocks. After these events, the corresponding polypeptide segments would be expected to fold in the same way as before the fusion. They would then, according to Goldberg [9], form 'globules' with independent folding. The connecting zones, formed of a carboxy and an N-terminus of two different proteins, were not *a priori* coded

Abbreviations. H-flavocytochrome b_2, flavocytochrome b_2 from *Hansenula anomala* yeast; S-flavocytochrome b_2, flavocytochrome b_2 from *Saccharomyces cerevisiae* yeast; $PhMeSO_2F$, phenylmethylsulfonyl fluoride.

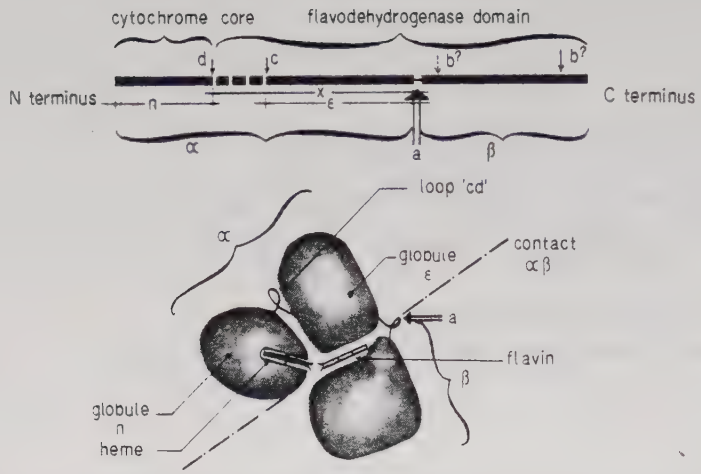

Fig. 1. *The loci of trypsin cleavage in H-flavocytochrome* b_2 *polypeptide chain; the triglobular model for a protomer.* Top: two very similar degradation schemes have been established for the *S. cerevisiae* enzyme [4] and the *H. anomala* enzyme [12]. There are uncertainties concerning the distance of c to d for the *H. anomala* enzyme, the position of b within β for the *S. cerevisiae* enzyme (near the C or N terminus of β?) and the width of locus a. The relative velocities of cleavage for the various bonds are not similar for the two enzymes ($a > b > d \gg c$ for *S. cerevisiae*) ($a \approx b > d \approx c$ for *H. anomala*). ε and β fragments are more resistant in *H. anomala* than x and β' in *S. cerevisiae*. The position of n at the N terminus of the chain was established for the latter enzyme [13]. Bottom: the triglobular model has been proposed for the *H. anomala* enzyme [5,11] taking into consideration (a) the degradation scheme (top), (b) the data on the explosion of the molecule after cleavage of the loops 'cd', the four cytochrome cores being detached from an $(\varepsilon\beta)_4$ flavodehydrogenase entity, and (c) the location of the flavin site at the $\alpha\beta$ interface as proposed for the *S. cerevisiae* enzyme [14]. This model finds additional support (a) in the present study that confirms, for the *H. anomala* enzyme, such a location for the flavin site and (b) in the recent finding that *S. cerevisiae* enzyme also breaks down into a flavodehydrogenase entity $(x\beta')_4$ with release of the four cytochrome cores in spite of the fact that the cleavage there is punctual in 'd' [6]

specifically to form a tight and stable folding assembly, hence their sensitivity to proteases. One question is: why does the structure remain polyglobular with protease-sensitive bonds rather than being remodeled into a unique protease-stable domain in further evolution? In fact the presence of connecting flexible hydrophylic segments, which finally form external loops, have been shown greatly to facilitate independent folding of each 'folding unit' [10] or, by extension, each globule. These flexible segments also aid the final interglobule adjustment of these units for ulterior assembly.

The triglobular model [5, 11] established for the *Hansenula anomala* flavocytochrome, H-flavocytochrome b_2, is presented in Fig. 1. The most sensitive zone, that cleaved most quickly by trypsin and other proteases, is called 'a' and lies between two polypeptide segments (molecular weights $\approx$ 38 000 and 22 000) forming the 'domains' α and β respectively. Its cleavage results in a dramatic loss of activity in the electron-transfer catalysis from L-lactate to ferricyanide (or ferricytochrome *c*). The second zone called 'cd', lies in the segment α and is cleaved markedly more slowly, finally yielding two fragments, n and ε with a loss of approximately 70 residues. This 'loop cd' has been shown to present a particular character because it connects two functionally interdependent domains that apparently have no affinity for each other, since they dissociate as soon as that loop is cleaved by trypsin. These two functional domains are (a) the lactate flavodehydrogenase domain, that maintains a tetrameric quaternary structure and is active in the electron transfer to ferricyanide but not to cytochrome *c* and (b) the cytochrome domain.

This cytochrome entity, a 'b_5-like' molecule, was formerly characterized as resistant to drastic tryptic degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome, S-flavocytochrome b_2, and was called the cytochrome b_2 core [15–19]. It is actually homologous to microsomal cytochrome b_5 in its amino acid sequence [20, 21]. When within the native enzyme, it acts as a privileged acceptor of electrons supplied by the flavodehydrogenase moiety (intramolecular reaction [22]) and specific donor to cytochrome *c* [23, 24]. A similar cytochrome core exists in the *H. anomala* enzyme; it corresponds to the fragment n, while the flavodehydrogenase corresponds to $(\varepsilon\beta)_4$ (Fig. 1).

In order to understand the role of the two domains α and β in the formation of the flavin binding site, the best approach involves primarily their separation from a nicked flavocytochrome b_2, followed by a study of the respective capacity of each to bind flavin.

Such a study has already been carried out on the *S. cerevisiae* enzyme but under rather inadequate conditions, because of the low resolution achieved in the separation. We present here results obtained from a more detailed and elaborate study of the *H. anomala* enzyme.

A procedure is described which allows, after trypsin cleavage of H-flavocytochrome b_2 under definite con-

ditions, a quantitative separation of α and β, by means of chromatography in 4 M urea. A study of the structural parameters (derived from sedimentation and tryptophan fluorescence data) of isolated and mixed α and β fragments, either in 4 M urea or after renaturation, gives information (a) on the stability and the capacity of independent folding of the two domains α and β (and of the two globules n and x within α), (b) on the entities required for the creation of an efficient flavin binding site, and (c) on the distribution in the three globules of areas controlling the stability of the tetramer assembly.

MATERIALS AND METHODS

STANDARD BUFFERS

All the solutions were made in bidistilled water. Phenylmethylsulfonyl fluoride ($PhMeSO_2F$) was added at a final concentration of 1 mM to all solutions at each step after proteolysis in order to protect samples from possible further degradation.

Phosphate/lactate A, pH 7 or 8: 0.15 M NaK_2PO_4; 0.1 M sodium DL-lactate; 0.25 mM EDTA, equilibrated to the necessary pH.

Phosphate/urea B, pH 7: 0.05 M NaK_2PO_4, 4 M urea, 0.25 mM EDTA, 3 mM $PhMeSO_2F$, with or without 0.1 M 2-mercaptoethanol.

Phosphate/lactate C, pH 7, called 'renaturing': identical to phosphate/lactate A, either with addition of 2-mercaptoethanol (final concentration 0.1 M, then deoxygenated by nitrogen bubbling, and used under anaerobic conditions) or without 2-mercaptoethanol (as indicated for each experiment).

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

H-flavocytochrome b_2

A detailed description of preparation procedure and analytical parameters with reference to original papers has been recently reviewed [25]. Essential data together with additional techniques are given below.

Hansenula anomala yeasts were grown in the *Laboratoire d'Extraction et de Fermentation* of the *C.N.R.S.* Flavocytochrome b_2 was purified according to the technique of Naslin and Iwatsubo [25] but acetone precipitations were omitted and the precipitate was stored after DEAE-cellulose elution and ammonium sulfate precipitation at 50% saturation.

This type of preparation is much more stable than those involving the standard acetone precipitations. For the experiments the red pellet, obtained after centrifugation of the stock suspension, was washed by resuspension in buffer A, pH 8, containing 50% saturation of ammonium sulfate, and recentrifugation. The new pellet was dissolved in the minimum amount of buffer A and centrifuged. The clear supernatant then contains practically only one component, as seen on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. The molar activity was maximal (1200 s^{-1}) and the absorbance ratio $A_{uv\,max}/A\ \gamma_{red}$ of the ultraviolet peak over the γ peak (at 422 nm) of the reduced form, close to 0.49. The resulting solution (about 1.5 ml with a protein concentration of approx. 45 mg/ml) was filtered on a G-25 Sephadex column (internal diameter = 2 cm, length = 7 cm) equilibrated with the same buffer to remove the remaining ammonium sulfate without diluting the enzyme too much. For this reason only the first sufficiently concentrated fraction (approx. 15 mg protein/ml) was collected.

The prosthetic heme concentrations were measured with a (Cary 15) spectrophotometer ($\varepsilon_{422\,nm}$ = 183 $mM^{-1}\,cm^{-1}$ for flavocytochrome b_2 reduced in the presence of lactate or thiosulfite; $\varepsilon_{412\,nm}$ = 129 $mM^{-1}\,cm^{-1}$ for the oxidized form (in the absence of lactate, spontaneous auto-oxidation occurs); $\varepsilon_{412\,nm,\,ox}$ = 121 $mM^{-1}\,cm^{-1}$ for the cytochrome form without flavin.

In order to follow the inactivation during tryptic proteolysis, 2–5-µl aliquots were collected at regular intervals and added to 3 ml standard solution for activity measurements (the reduction of 1 mM ferricyanide by 10 mM L-lactate was followed at 30 °C, pH 7).

Concentration of Free and Bound Flavin

The fluorimetric procedure [26] is based on the fact that flavin, when attached to flavocytochrome b_2, has no fluorescence. A comparison of the fluorescence of samples with that of free FMN (both excited in parallel at 450 nm and read at 536 nm) gives the amount of free flavin present (which remains oxidized if care is taken to avoid photoreduction). This measurement is made without dilution of flavoprotein samples to avoid possible dissociation. The amount of total flavin (free + bound) is determined from the fluorescence intensity of an aliquot diluted in 6 M urea where total dissociation is achieved. We checked, as recommended by Wassink and Mayhew [27], that the results with FMN as a standard did not differ within 5% from those obtained with riboflavin. In both cases the value ε = 12.5 $mM^{-1}\,cm^{-1}$ at 450 nm was taken into consideration for measuring the concentrations.

Concentration of Tryptophan Residues

This was determined by the fluorimetric method of Pajot [28] in 6 M guanidine-HCl (with 30 mM 2-mercaptoethanol), excitation at 295 nm, emission measured at 354 nm and compared by inner calibra-

tion with that of DL-tryptophan ($\varepsilon = 5.71\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ in a phosphate buffer, pH 7 at 280 nm). For the calculations, the fluorescence intensity of a tryptophan residue in protein samples denatured in the same medium at pH 7 was approximated as equal to that of free tryptophan. Measurements made twice on the same sample were reproducible within 5–7% provided that the guanidine incubation was prolonged for about 20 min before measurement. Results obtained with samples stored in the presence of $PhMeSO_2F$ and 2-mercaptoethanol in different experiments varied appreciably from one sample to another.

Control of Saturation of Heme Sites

Certain samples stored for several weeks in 4 M urea lost part of their heme, as revealed by the high tryptophan/heme, molar ratio. In such cases, spectra traced after addition of successive aliquots of hemin up to the equivalent point show the typical pattern of bound heme with a maximum at 412 nm up to the equivalent point. Free hemin added in excess has its absorption maximum at 390 nm. From absorbances at 412 nm and 390 nm it is possible to calculate the amounts of free and bound heme by the classical formula:

$$(\text{free hemin})_{mM} = (A_{390} \times \varepsilon_{\text{bound},412} - A_{412} \times \varepsilon_{\text{bound}\,390})/D$$

$$(b_2 \text{ bound heme})_{mM} = (A_{412} \times \varepsilon_{\text{free},390} - A_{390} \times \varepsilon_{\text{free},412})/D$$

where $D = (\varepsilon_{\text{free},390} \times \varepsilon_{\text{bound},412} - \varepsilon_{\text{free},412} \times \varepsilon_{\text{bound},390})$ and the values for ε are as follows: at 390 nm, free form = $45\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, bound form = 47; at 412 nm, free form = $30\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, bound form = $117\ mM^{-1}\ cm^{-1}$. These values [29] are in accordance with a standard value of $60.3\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ for free hemin in 0.1 M NaOH [30]. The calculations were made with a standard program in a Hewlett-Packard calculator 9100 B. For samples which might be partially reduced, the isosbestic wavelength near 417 nm for bound hemin should be used. Owing to the very low dissociation constant of the heme-protein complex (10^{-15} M for the *S. cerevisiae* enzyme at pH 7 [31]), there is a quantitative binding (no free heme) to the equivalent point at least when titrations are carried out in the concentration range above 1 µM protein and when the apoenzyme samples are in good state. However, for *H. anomala* enzyme derivatives in several instances, probably because of an irreversible alteration of the heme site, we observed non-quantitative binding of heme in the concentration range 0.1–0.3 µM (i.e., presence of free hemin as well as bound heme under the equivalent point).

Standard Renaturation Procedure for Flavin Rebinding

The protein samples submitted to 4 M urea (buffer B) were put in dialysis bags after addition of 600 µM FMN and 30–40 µM hemin (in slight excess over concentration of α chains). The dialysis was carried out at 3 °C, in an oscillating closed device against buffer C, either with 2-mercaptoethanol (100 mM) under anaerobic conditions after nitrogen bubbling, or without 2-mercaptoethanol. The buffer was changed three or four times during 1–2 days. When 2-mercaptoethanol was present in the dialysis buffer an additional 1-day dialysis was performed with buffer C without this reagent.

This procedure leads [14] to renaturation and maximal flavin binding to functional flavin sites before flavin has been extensively diluted out of the bag. To this end, protein concentrations have to be in large excess over the dissociation constant of the flavoprotein.

Polyacrylamide/Sodium Dodecylsulfate Gel Electrophoresis

This was done according to the standard method of Weber and Osborn [32] and the procedure (using vertical plates) described in [33] with 15% acrylamide on an Apelab ST 52 apparatus with refrigeration at 4 °C. The samples from tryptic hydrolysates were immediately frozen in liquid nitrogen after addition of $PhMeSO_2F$ (final concentration 10 mM). Just before electrophoresis the same amount of $PhMeSO_2F$ was re-added to prevent proteolytic degradation during the denaturation step, which was achieved by addition of an equal volume of denaturing buffer (0.1 M Tris-HCl pH 6.8; 4 mM EDTA; 4% sodium dodecylsulfate, 300 mM 2-mercaptoethanol, 20% v/v glycerol) and heating for 15 min at 80 °C. When samples (10–20) were deposited on a plate, an increasing tension was applied up to 500 V to maintain a constant intensity of 35 mM for about 4 h. After fixation (in methanol/acetic acid/water: 45/10/45 for 1 h), staining by Coomassie blue 0.25% (in methanol/acetic acid/water: 50/7/43) under stirring at 37 °C for 1 h, destaining (in methanol/acetic acid/water: 10/7/83), the gels were photographed with a polaroid camera to obtain positive transparencies that were densitometrically analyzed when necessary.

The 'standard' molecular weights given in this article (see legend of Fig. 2) were calculated from the standardization curve, $\log M_r$ versus distance from insertion, obtained by linear regression from migrations of the following proteins on the same plate (inner calibration). For H chains and α_H: bovine serum albumin, 68000; catalase, 60000; γ globulin subunit I, 52000; beef heart LDH, 36000. For β_H, χ_H, ε_H, n, and n_2: γ globulin subunit II, 23500; soya

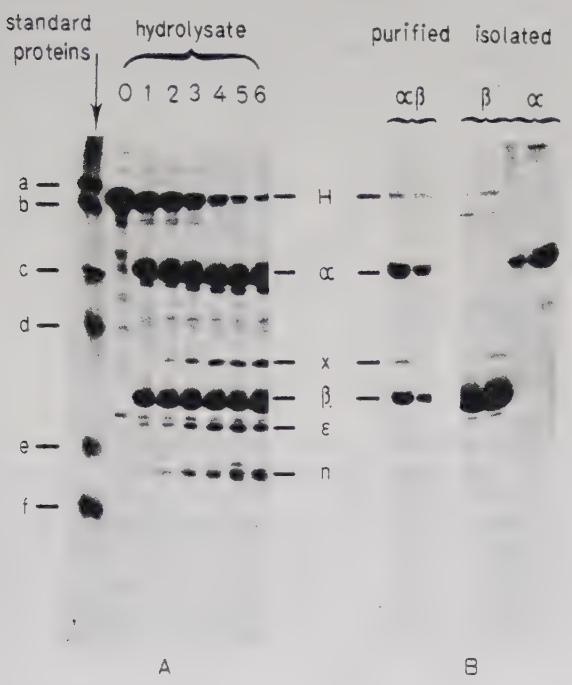

Fig. 2. *Formation and separation of trypsic fragments α and β; characterization of the polypeptidic species present at various steps in the course of the preparation. Patterns after electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate.* The initial sample of 'intact' H-flavocytochrome b_2 (hydrolysate 0) contains 'intact' chains H and traces of contaminants. Samples 1–6 correspond to aliquots taken up at different time (respectively 2, 10, 24, 40, 62 and 90 min) after addition of trypsin (final concn = 2.1 μM) to H-flavocytochrome b_2 (250 μM) in phosphate/lactate A, pH 8, incubated at 20 °C. The 'purified', nicked enzyme $\alpha\beta$ corresponds to samples after step 2 (see text). The isolated β and α fragments correspond respectively to peak I and II after step 4, cf. Fig. 3. (A) The first run corresponds to the standard protein pool used as an inner calibration: (a) bovine serum albumin; (b) γ-globulin I; (c) lactate dehydrogenase; (d) γ-globulin II; (e) β-lactoglobulin; (f) cytochrome *c*. The standard estimate of M_r of the different fragments as averaged for all 20 experiments (see Materials and Methods) are 60600 for H, 38500 for α, 23900 for x, 21300 for β, 16700 for ε, and 14600 and 13800 for n_1 and n_2

trypsin inhibitor, 21500; β-lactoglobulin, 18400; myoglobin, 17200; lysozyme, 14300.

REAGENTS AND RESINS

Sephadex G-25 'fine' was used according to the procedures advised by the manufacturer (Pharmacia). DEAE-cellulose (Whatman, DE-52 wet microgranular variety) was cleared from the fine particles before use and equilibrated for 10 h with the adsorption buffer. $PhMeSO_2F$ (Merck): the 100 mM stock solution was prepared in isopropanol and kept not longer than one month at room temperature (no alteration takes place under these conditions [34]. Sodium dodecylsulfate was from Serva (Heidelberg); guanidine-HCl, Mann Research Lab., ultra pure; sodium DL-lactate, Prolabo; ammonium sulfate, urea, 2-mercaptoethanol, $NaH_2PO_4H_2O$ and $K_2HPO_4 \cdot 3\,H_2O$, Merck. Bromophenol blue and *N,N,N′,N′*-tetramethylethylenediamine (Temed) were from Canal Industrial Corporation and acrylamide from Labo International (Holland); FMN (flavin mononucleotide) was from Sigma, and EDTA from Hopkin & Williams.

RESULTS

PREPARATION OF ISOLATED α AND β FRAGMENTS

Tryptic Cleavage in αβ (Step 1)

Proteolysis of H-flavocytochrome b_2 (about 200 μM) by trypsin (about 0.050 mg/ml, i.e. 2 μM) at 20 °C, was accompanied by a loss of activity according to a first-order decrease for up to 90% of the reaction [4, 12]. The values of k_{app}/[trypsin] and of k_{app}[H-flavocytochrome b_2]/[trypsin], (i.e. k_{cat}) were close to 400 $M^{-1}\,s^{-1}$ and 0.1 s^{-1} respectively. Under these conditions, the molar activity of H-flavocytochrome b_2, initially 1200 s^{-1}, decreases down to a plateau at about 40 s^{-1} after 100–150 min incubation. The proteolysis was then stopped by addition of $PhMeSO_2F$ (final concentration 8 mM) together with diluted HCl (down to pH 7). As shown in Fig. 2, this hydrolysate mainly contains α and β fragments, but also some fragments identified as degradation products of α: n and x (both resulting from the cleavage of α at point 'd', Fig. 1), and ε (resulting from x by another cleavage in 'c'). Traces of residual intact chains, termed H, still appeared to be present, unless they were αβ species that were not dissociated under the conditions of the electrophoretic assay. Thus, the hydrolysate contains a major component 'nicked' flavocytochrome b_2 formed of αβ protomers. The best estimates of molecular weight by the procedure of Shapiro et al. [35] were 60600 for H chains, 38500 for α, and 21300 for β indicating that the loss of peptides in the cleavage is small or zero.

Chromatographic Purification of Nicked Flavocytochrome b_2: $(\alpha\beta)_4$ *(Step 2*

Chromatography of the total hydrolysate on DEAE-cellulose equilibrated in phosphate lactate buffer A, pH 7, resulted in adsorption of the major part of the red cytochrome component as a slowly migrating narrow band. Washing with the same buffer (about 60 ml) eliminated the non-adsorbed species. These proved to be n, ε and possibly a small amount of β, together with trypsin, which being basic is not adsorbed under these conditions.

Elution was achieved by addition to the above buffer of ammonium sulfate at 5% saturation. This detached the nicked flavocytochrome; but the corre-

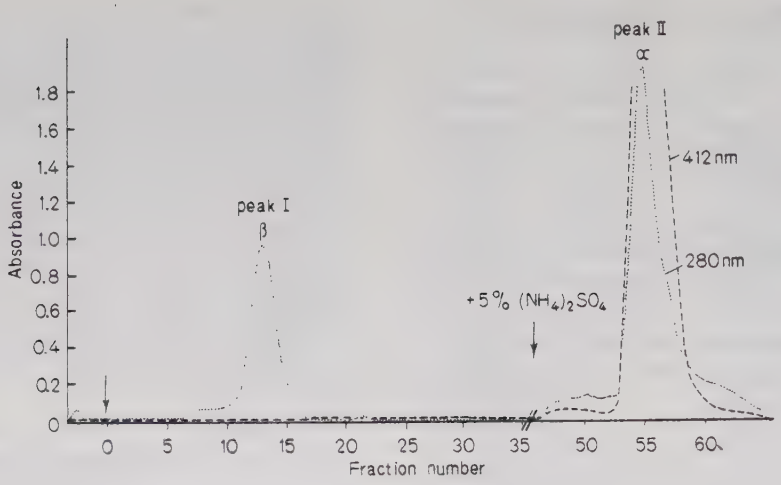

Fig. 3. *Step 4. Elution pattern of α and β fragments: chromatography on a DEAE-cellulose column of the nicked flavocytochrome* b_2 *denatured in 4 M urea.* 40 mg nicked flavocytochrome b_2 $(\alpha\beta)_4$, in phosphate/urea buffer B after step 3, were poured on a DEAE-cellulose column (diameter = 2 cm, h = 12 cm) preequilibrated in the same buffer. The elution was followed at 280 nm and 412 nm with a recording, continuous flow, two-wavelength densitometer SEIVE. The colorless component corresponding to peak I was eluted by washing with the same buffer. It was identified as species β, cf. Fig. 2. The red component corresponding to peak II was eluted after addition of ammonium sulfate at 5% saturated in buffer B. At the maximum of the ultraviolet peak, the absorbance at 412 nm then became out of scale. The spectrum of the corresponding pooled fractions is presented in Fig. 4. This species was identified as α, cf. Fig. 2

sponding α and β chains remained contaminated by traces of α- and n. n remained in solution after a second precipitation with ammonium sulfate (final saturation 50%). The nicked flavocytochrome is tetrameric $(\alpha\beta)_4$ at high ionic strength (Table 2).

Separation of α and β Fragments by Urea (4 M) Chromatography (Steps 3 and 4)

After centrifugation, the $(\alpha\beta)_4$ sample was dissolved in phosphate/urea buffer B and denatured for 1 h at 0 °C. The sample was then filtered on a Sephadex G-25 column also equilibrated with buffer B. Residual ammonium sulfate and dissociated flavin were thus separated (step 3).

The filtrate was poured on a DEAE-cellulose column (h = 12 cm, diameter = 2 cm) pre-equilibrated with buffer B (this chromatography corresponds to step 4). Fractionation resulted in a quantitative separation of the chains (Fig. 3), which occurred similarly whether 2-mercaptoethanol was present or absent. The first colourless peak corresponds to non-adsorbed species, eluted by washing with the equilibrating buffer. As shown by electrophoresis assays in the presence of sodium dodecylsulfate (Fig. 2) it consists of pure, non-retained, β chain.

When the ultraviolet absorbance of the eluate had returned to zero, the red cytochromic component was eluted by addition of 5% saturation ammonium sulfate to the last buffer. This yields the α polypeptidic species (Fig. 2), generally pure. All the fractions corresponding to peak I und II respectively were pooled and kept at 4 °C. The absorbance spectrum of α in 4 M urea is shown in Fig. 4

RENATURATION OF ISOLATED OR MIXED FRAGMENTS α AND β

The α and β samples separated as above were dialysed by the standard renaturation procedure after addition of FMN in large excess and, for some experiments of hemin in slight excess as described in Material and Methods.

Samples of the nicked enzyme in 4 M urea, $(\alpha\beta)_{NS}$ (NS meaning not separated into α and β chains), and of a stoichiometric mixture of isolated α and β [termed $(\alpha + \beta)_{mixed}$] were treated in parallel. Very different results were obtained according to whether 2-mercaptoethanol was present or absent during this dialysis.

Flavin and Heme Content

One should first note that the α samples that had not remained long in 4 M urea had not lost any heme, as shown by a tryptophan/heme ratio which was close to 3 mol/mol (Table 1), and the fact that addition of hemin did not increase the quantity of bound heme. On the contrary, the samples which had remained for several weeks in 4 M urea lost up to 90% of their prosthetic heme (tryptophan/heme = 25 mol/mol). In such a case the holo-α can be reformed quantitatively by addition of hemin (Fig. 5) with a restored ε value of approximately 110 ± 10 mM^{-1} cm^{-1}. In order to avoid the presence of renatured chains not saturated by heme, all the last series of renaturation experiments reported here were performed just after obtaining the samples and with addition of hemin at the beginning of the renaturing dialysis. Under such conditions the heme sites were always saturated as shown by the

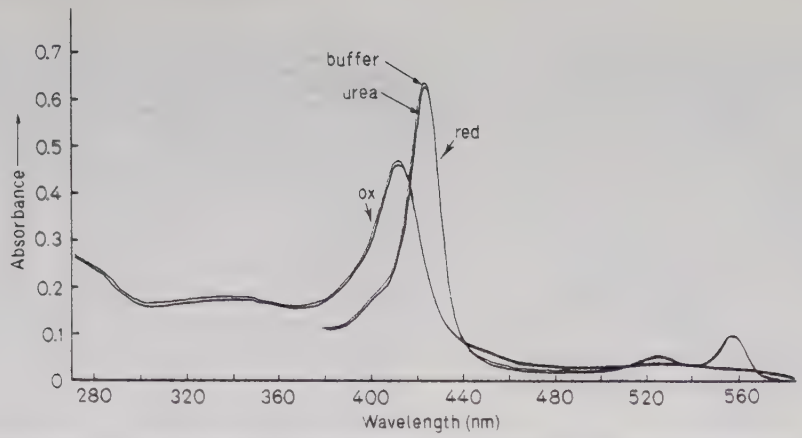

Fig. 4. *Cytochromic spectra of α in buffer and in 4 M urea.* Two identical aliquots of a sample of α (peak II cf. Fig. 3, after standard renaturation with hemin) were diluted respectively (a) in 1 ml 100 mM phosphate buffer pH 7 and (b) in 1 ml phosphate/urea buffer B. Spectra were recorded with a Cary spectrophotometer model 219 with a same memorized baseline, without (oxidized form) or after addition of a crystal of dithionite (reduced form). The spectrum in urea was not significantly changed after a 30-min incubation

Table 1. *Binding of flavin to α and αβ after renaturation in the presence or absence of 2-mercaptoethanol. Functionality of bound flavin*
The various samples, initially in 4 M urea and deprived of flavin, were submitted to a standard renaturation dialysis (see Materials and Methods) against lactate/phosphate buffer C, after their mixing with excess FMN and protohemin (starting concentrations in the bags respectively: 600 μM and 30 μM). Two kinds of conditions were used for each sample: without 2-mercaptoethanol in the first and second phase of the dialysis; with 0.1 M 2-mercaptoethanol in the first phase of the dialysis. The samples were: $\alpha\beta_{NS}$, denatured, nicked enzyme not separated into its component chains; α, peak II after chromatography cf. Fig. 3; and $(\alpha + \beta)_{mixed}$, an equimolar mixture of separated α and β chains. Parallel experiments with isolated β were carried out but are not reported here, since they led to a precipitated material, without bound flavin. In the lower part of the table are given parallel, mean data on non-denatured, intact or nicked enzyme. In order to make explicit the conditions in which binding was tested, the concentrations of protomers (equal to heme concentrations, as verified), of bound flavin and of residual free flavin (equal inside and outside the bags), are given for each particular experiment presented. Data on tryptophan concentrations were not very accurate and do not clearly indicate whether or not one tryptophan residue is lost in all (or in part) of the nicked molecules. Each set of analytical data corresponds to one sample (dialysis bag content after renaturation); they are typical results such as those repetitively obtained in several series of independent experiments

Samples	FMN and heme bound											
	without 2-mercaptoethanol						with 2-mercaptoethanol					
	free FMN	bound FMN	bound heme	Trp/ heme	FMN/ heme	mol. act., bound FMN	free FMN	bound FMN	bound heme	Trp/ heme	FMN/ heme	mol. act. bound FMN
	μM			mol/mol		s^{-1}	μM			mol/mol		s^{-1}
After renaturation												
$\alpha\beta_{NS}$	0.16	1.84	17.0	4.3	0.11	53	0.29	11.7	10.5	5.0	1.0 ± 0.1	37
	0.71	2.0	15.0	4.5	0.13	–	1.3	41	52	5.2 ± 0.3	0.79	34
α	0.15	0	38.0	2.5	< 0.004	–	0.16	0	46	2.7 ± 0.2	< 0.004	–
$(\alpha + \beta)_{mixed}$	1.5	0.6	5.0	3.8	0.12	57	0.21	8.2	15	3.2	0.55	24
							0.32	6.5	15	3.2	0.43	21
Control												
Intact H	–	–	–	5.03	0.95	1100						
				± 0.35	± 0.05	± 100						
Nicked αβ				3.4	–	40						
				± 0.1		± 5						
b_2 core n				2.0	0							

tryptophan/heme values close to 3 mol/mol and the fact that addition of hemin did not result in additional binding. The absorbance spectrum of renatured α (Fig. 4) is nearly the same in neutral buffer and in 4 M urea and identical, except in the 260–300-nm range, to that of cytochrome b_2 core.

In the presence of 2-mercaptoethanol the binding yield of flavin (Table 1) on the $(\alpha\beta)_{NS}$ and $(\alpha + \beta)_{mixed}$ samples was currently between 50–70%, flavin/heme, and occasionally reached 100%. However, in the absence of 2-mercaptoethanol, this yield was no higher than 10%. The reconstituted molar activity

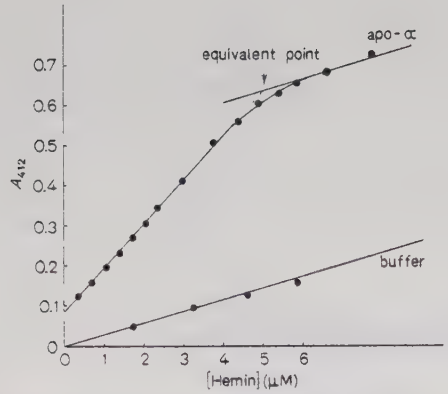

Fig. 5. *Binding of heme to apo-α.* A sample of isolated α in 4 M urea (phosphate/urea buffer B) was stocked for 3 weeks before standard renaturation, carried out with 2-mercaptoethanol but without added hemin. To an aliquot diluted in 1 ml phosphate/lactate buffer (final concentrations 1.12 μM bound heme, 26.4 μM tryptophan residues) successive aliquots of hemin, each yielding of 0.35 μM increment, were added. Visible spectra were recorded after each addition (not shown). Absorbance increases with λ_{max} at 412 nm (bound heme b_2). The titration followed at 412 nm is presented here. The linear increase of A_{412} upon hemin addition up to the equivalent point corresponds to $\varepsilon = 110\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$, close to $\varepsilon = 120\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, value determined for cytochrome b_2. After saturation of heme binding sites, added hemin exhibits a λ_{max} at 390 nm with an ε value equal to $28\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ as for free hemin in the same medium (parallel control without protein). At the equivalent point tryptophan/bound heme = 3.8 mol/mol. The best estimate for tryptophan/heme for α in all the experiments with fresh samples seems to be 3 mol/mol

per bound flavin was about the same as that of the nicked non-denatured enzyme.

No flavin was found bound to the α chains after renaturation (Table 1); the amount of bound flavin has always been under 0.4% (even for concentrations of 50 μM for the protein). This implies that a flavin site, if it were present on α, would have a dissociation constant higher than $50 \times 100/0.4$ μM, that is 10 mM. α chains renatured in the presence of FMN have no detectable enzymatic activity in the standard test.

When alone, samples of β chains that had undergone this renaturing treatment precipitated. The precipitate can be dissolved in 1.5 M urea and contained no flavin. However, during renaturation of the α + β mixture in the presence of 0.1 M 2-mercaptoethanol, the β chains did not precipitate (except when β was in excess). This indicates that β solubilization is facilitated by the presence of α, to which it attaches.

Sedimentation Studies

Table 2 shows the sedimentation constants obtained for the native and renatured species under conditions of high and low ionic strengths. It has been reported [36] that the *H. anomala* enzyme dissociated more or less completely into monomers with loss of its activity after a 1-h incubation at low ionic strengths in the absence of L-lactate. By comparing the sedimentation coefficients, the expected molecular weights of the different monomeric, dimeric, and tetrameric forms of each species, and the friction coefficients, f/f_0, that can be calculated for each of them, reasonable conclusions can be drawn as to the species actually present.

At high ionic strength the tetrameric form of the intact enzyme ($M_r = 242000 \pm 12000$ as determined by sedimentation equilibria [1]) sedimented with $s_{20,w} = 9.4$ S and f/f_0 close to 1.37. The non-denatured, nicked form ($s_{20,w} = 9.0$ S), therefore, also seems to have an identical quaternary structure and so has the not-separated form renatured in the presence of 2-mercaptoethanol ($s_{20,w} = 8.7$ S, $f/f_0 = 1.45$). α does not form a stable tetramer when it is renatured and centrifuged under identical high ionic strength conditions. Indeed, it generally sedimented with $s_{20,w} = 2.8$ S, which for the monomer would give a friction coefficient of about 1.34, a reasonable value. However, it sometimes contains heavier species ($s_{20,w} = 4-5$ S), which probably correspond to the dimer, with $f/f_0 = 1.4$. Therefore, the stability of the tetrameric form is much lower for the isolated α domain than for the assembly αβ or the intact *H. anomala* enzyme chain.

When renatured in the absence of 2-mercaptoethanol, samples of $(\alpha + \beta)_{mixed}$ (those yielding only a 10% recovery of flavin sites, Table 1) exhibited an ultracentrifugation pattern showing the presence of the tetramer $(\alpha\beta)_4$ of 8.1 S as a minor component (10–20%). The nature of the major component of 4.6 S is not clear; it is probably a non-resolved mixture of dimers and monomers possibly in dynamic equilibrium (any of them, alone, could have a frictional ratio of 1.8 (too high) or 1.02 (too low). Thus, there is a clear correlation between the inefficiencies when disulfide-reducing agents are absent, to reform both a correct flavin-binding site and a correct quaternary structure.

At low ionic strengths the samples submitted to ultracentrifugation runs were previously submitted to a 'monomerization' treatment according to [36]. (In our hands 3 h incubation in 10 mM phosphate at room temperature, instead of 1 h, was necessary to obtain 95% inactivation.) Under these conditions a sedimentation coefficient of 3.7 S was obtained for the *H. anomala* enzyme, in agreement with a monomer of frictional ratio of 1.37 equal to that of the native tetramer. Submitted to the same treatment, the nicked enzyme gives a species of apparently 2.39 S; if it were the monomer, f/f_0 should be equal to 2.1, a very high value as compared to that of *H. anomala* monomers. The probable composition of the 2.39-S component is an unresolved mixture of α and β monomers (mean molecular weight 29000, with $f/f_0 = 1.30$ in line with values obtained for isolated α, $f/f_0 = 1.34$, and for isolated β in 1.5 M urea, $f/f_0 = 1.22$).

Table 2. *Ultracentrifugation: sedimentations studies*
The various samples, either control (not denatured) or renatured as described in Table 1, were submitted to ultracentrifugation analytical sedimentation after dialysis in different buffers: (A) phosphate/lactate A, pH 7 (cf. Materials and Methods); (A′) identical to buffer A except for a higher phosphate concentration = 200 mM; (D) 100 mM phosphate pH 7 without lactate; (E) buffer A containing 1.5 M urea; (F) 10 mM phosphate pH 7, without lactate. In this case the sample was incubated for 3 h at 20 °C for monomerization according to [36]. Ultracentrifugation runs were performed in a Beckman model DU analytical ultracentrifuge at 4 °C and monitored by monochromatic light at 413 nm for all the samples except β, which was followed at 280 nm. For the samples $\alpha\beta_{ND}$ at low ionic strength, both wavelengths were used and led to similar values (respectively 2.30 S and 2.40 S). The corrections for the calculations of $s_{20,w}$ took into consideration the following factors: $\eta_{4,w}/\eta_{20,w} = 1.57$ [37]; $\eta_{20,sol}/\eta_{20,w}$ values as measured were respectively 1.133, 1.15, 1.030, 1.16 and 1.013 for A, A′, D, E and F. $v_{4,sol}$ is 0.742 $cm^3\ g^{-1}$ and $v_{20,w} = 0.751\ cm^3\ g^{-1}$ [38]; $(\varrho_{sol}/\varrho_w)_{20°}$ values as measured were 1.0228, 1.012, 1.043 and 1.0015 for buffers A, A′, D, E, F respectively. The protomer molecular weights taken into consideration were those estimated, cf. Fig. 2, in agreement for H_4 and H with sedimentation equilibrium determinations [1]. The frictional coefficient f/f_o, was calculated by the classical formula: $(3.3 \times 10^{-3} \times M_r^{2/3})/s_{20°,w}$ (S) for each possible quaternary assembly. HSEtOH = 2-mercaptoethanol

Samples		HSEtOH during renaturation	Buffer in ultracentrifugation runs		$s_{20,w}$	Assumed assembly		Corresponding M_r	Calculated f/f_o
					S				
Ultracentrifugation at high ionic strength									
Control	H	−	A		9.4	H_4	→	242000	1.36
	$\alpha\beta_{ND}$	−	A		9.0	$(\alpha\beta)_4$	→	239000	1.41
After renaturation	$\alpha\beta_{NS}$	+	A′		8.73	$(\alpha\beta)_4$	→	239000	1.45
	$\alpha\beta_{NS}$	−	A	min	8.10	$(\alpha\beta)_4$	→	239000	1.56
				maj	4.60	$(\alpha\beta)_2$	→	119500	1.74
						$\alpha\beta$	→	59800	1.09
	$(\alpha+\beta)_{mixed}$	−	A	min	8.0				
				maj	4.1 or 2.8				
	α	−	A		4.2	α_2	→	77000	1.42
		+	A′		5.1	α_2	→	77000	1.17
						α_4	→	154000	1.86
		+	A′		2.75	α	→	38500	1.34
		+	D		2.85				
Ultracentrifugation in 1.5 M urea									
	β	+	E		2.07	β	→	21300	1.22
Ultracentrifugation at low ionic strength									
Control	H	+	F		3.7	H	→	60500	1.37
	$\alpha\beta_{NS}$	+	F		2.39	$\alpha\beta$	→	59800	2.11
						$\alpha+\beta$	→ $\bar{m}=$	30000	1.33
After renaturation	α	−	F		2.15	α	→	38500	1.75
		+	F		2.71	α	→	38500	1.38

As a conclusion to this study of the sedimentation behavior of the various samples, we can tentatively consider the intact and nicked enzymes as globular tetramers exhibiting a low ellipticity, a structure recovered after denaturation and renaturation in the presence of 2-mercaptoethanol for the nicked enzyme. When the sulfhydryl-reducing reagent it absent, the major part does not reassociate into tetramers. Quite remarkable is the behavior of α, which remains essentially monomeric.

Tryptophan Fluorescence

Since some of the samples are cytochromes or contain flavin, we used an experimental parameter allowing us to characterize tryptophan fluorescence easily, even in the presence of molecules which absorb significantly in the 270–290-nm region of the spectrum. This parameter, as proposed by Risler and Labeyrie (unpublished results) is the ratio $(F_{sol}/F_{gua})_\lambda$, as defined in the legend of Table 3, from which can be calculated $\bar{q}\ q_{free}$, that is the relative (mean) quantum yield of tryptophan residues to that of free tryptophan. The formulation is based on the fact that complete denaturation of protein samples in 6 M guanidine-HCl normalises tryptophan fluorescence, which becomes equal after multiplication by 0.9 (for excitation between 270 nm and 285 nm) to that of free tryptophan in the same guanidine medium (see legend of Table 3).

Emission, measured as the height of emission peak, is only due to tryptophan residues for samples exhibiting peaks at 340 nm (apocytochrome b_2 core) or above (354 nm in neutral 6 M guanidine-HCl). For those with emission peaks between 320 nm and 330 nm, tyrosine might contribute significantly when tryptophan residues have a low quantum yield (unpublished observations). This is the case with the holocytochrome b_2 core, holo-α and intact H-flavocytochrome b_2.

Table 3. *Fluorescence parameters of tryptophan residues in H-flavocytochrome* b_2 *derivatives; mean quantum yields relatively to free tryptophan and emission wavelength*

Identical aliquots (20 – 50 µl) of samples (all flavin-free) were added to 1 ml of the following solutions at pH 7, 20 °C: (a) 100 mM phosphate buffer, pH 7; (b) phosphate/urea buffer B without 2-mercaptoethanol, pH 7; (c) 6 M guanidine-HCl in 100 mM phosphate, pH 7; in the latter case the measurements were carried out after a 30-min incubation. Emission spectra were recorded for a series of excitation wavelengths from 270 nm to 295 nm. When the dilution provoked a change of medium (4 M urea to buffer for β, or buffer to urea for α and the cytochrome core), spectra were traced several times until constant. For the different samples the bandwidth at half-height did not vary appreciably and the excitation peak was near 285 nm. In 6 M guanidine-HCl, condition (c), $\lambda_{max,\ emission}$ was at 354 nm. At each excitation wavelength, fluorescence intensities, F_{sol}, conditions (a) or (b) and F_{gua}, condition (c), were read at emission peaks. The ratio $(F_{sol}/F_{gua})_\lambda$ did not vary appreciably when the excitation wavelength varied from 270 nm to 285 nm; the average values are listed here. The mean quantum yields of tryptophan residues, in relative values as compared to free tryptophan, $\bar{q}/q_{free}$ are calculated as: $0.9 \times (F_{sol}/F_{gua})_{protein}/(F_{sol}/F_{gua})_{free\ tryptophan}$, according to the procedure devised by Risler and Labeyrie (unpublished results)

Samples	In phosphate pH 7			In phosphate/4 M urea pH 7		
	λ_{max} emission	F_{sol}/F_{gua}	$\bar{q}/q_{free}$	λ_{max} emission	F_{sol}/F_{gua}	$\bar{q}/q_{free}$
	nm			nm		
Without flavin						
Holo-cytochrome b_2 core	330	0.06 0.15	0.05 – 0.13	343	0.18	0.15
Apo-cytochrome b_2 core	342	0.40[a] 0.84[b]	0.35 – 0.70	350	1.2	1
Apo-cytochrome b_2 core + heme rec.	342	0.33[a] 0.15[b]	0.1 – 0.3	350		
Holo-α	327	0.27[c] 0.64[c]	0.22 – 0.55	338	0.57	0.46
β	330	1.45 1.55	1.24	350	1.20	1.0
With flavin						
Intact H-flavocytochrome b_2	320	0.35 0.39	0.31	345		

[a, b] Samples in different experiments give values presenting large differences; [a] and [b] correspond to two typical samples of apo-cytochrome b_2 core (before and after heme addition) with extreme sets of values.

[c] Extreme values found for holo-α samples.

The number of tryptophan residues in intact H-flavocytochrome b_2 is 5/protomer. A preliminary determination for the nicked-form (Table 1) gave a value that could correspond to 4/protomer. If confirmed, this result could indicate that 1 tryptophan residue could have been lost during the cleavage. The distribution of those residues among the different globular entities is 2 for the cytochrome core (globule n) 3 for α (i.e. the n-x assembly) and therefore 1 for x, and 1 or 2 for β.

The first species studied here was the H-cytochrome core (globule n) obtained from the entire enzyme after a drastic tryptic attack as described for the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome core. It contains 2 tryptophan residues (Table 1). This *H. anomala* cytochrome core, under its holo form, has a very low fluorescence ($\bar{q}\ q_{free} = 0.09 \pm 0.04$) due to tryptophan residues (excitation peak at 285 – 290 nm) with an emission peak at 330 nm, indicative of a hydrophobic environment. This fluorescence is partially quenched when heme is bound, since the apo form has a higher quantum yield ($\bar{q}\ q_{free} = 0.35$, increasing sometimes to 0.70) with an emission peak shifted to 342 nm, indicative of indole groups located at the surface of a folded protein. Addition of hemin up to the equivalent point decreases this yield by a factor of about 3 (0.35 – 0.1, or 0.7 – 0.3 for the most fluorescent samples). The isolated α fragment, with its heme bound (holo form) has a $\bar{q}/q_{free}$ value of 0.22, with an excitation peak at 285 – 290 nm, and an emission peak at 327 nm.

When equilibrated in 4 M urea, these different species are submitted to the following conformation changes. The apo core apparently takes an unfolded, denatured conformation where both tryptophans are normalized ($\lambda_{max\ 350\ nm}$, $\bar{q}\ q_{free} = 1$). The holo form has its emission peak shifted at 343 nm. The heme remains bound and still quenches fluorescence markedly, $\bar{q}/q_{free} = 0.15$. However, it is not possible to distinguish whether only one tryptophan fluoresces (in which case its proper $\bar{q}\ q_{free}$ value is 2×0.15 i.e. ≈ 0.30) or both of them. Holo-α, in 4 M urea, also has its emission peak red-shifted to 338 nm and a mean relative quantum yield increased by a factor of two compared with the value without urea, although this is still much lower (≈ 0.46) than values for free tryptophan. If we now consider β, its tryptophan(s) has (have) a relatively high fluorescence (1.24 in buffer)

Table 4. *Estimation of the relative quantum yields ($\bar{q}/q_{free}$) for each of the five tryptophan residues of $\alpha\beta$*

Sample	Tryptophan	Source of data	$\bar{q}/q_{free}$			
			in phosphate pH 7		in phosphate 4 M urea pH 7	
			apo	holo	apo	holo
n	1	assumed values[a]	0.12 0.35	0.02	0.5 1	0.03
n	1 + 2	mean exp. value (Table 3)	0.35 − 0.70	0.09 ± 0.04	1.0	1.15
α	1 + 2 + 3	mean exp. value (Table 3)	0.67	0.22 − 0.55	−	0.46
n	2	calculated value[b]	0.6 1.0	0.13 ± 0.06	1.5 1	≈ 0.25
x	3	calculated value[c]	1.2 − 0.7	0.5 − 1.4	−	1.1
β	4 (+ 5?)	mean exp. value	1.24	−	1.20	−

[a] According to values published for Trp-22 in S-cytochrome b_2 core (see text).

[b] Values are calculated as $(2 \times \bar{q}/q_{free})_n - (\bar{q}/q_{free})_{Trp\text{-}1}$. For the apo form in neutral buffer, it is assumed that $\bar{q}/q_{free}$ values of 0.35 and 0.70 for n correspond respectively to 0.12 and 0.4 for Trp-1. For the apo form in urea, $\bar{q}/q_{free}$ values of Trp-1 are supposed to be either 0.5 or 1.

[c] Calculated as $3 \times (\bar{q}/q_{free})_\alpha - 2 \times (\bar{q}/q_{free})_n$.

with a peak at 330 nm and is (are) normalized in 4 M urea.

With a number of assumptions (see Discussion) from data presented in Table 3, we can tentatively estimate the fluorescence parameters of each of the tryptophan residues pertaining to the $\alpha\beta$ assembly, and distributed in the different globular regions. To do this we have to assume that for α the emission contributions of each of the three tryptophan residues are purely additive.

Trp-1 is one of the two residues pertaining to the H-flavocytochrome core (globule n). We assume that it is identical to the single tryptophan, Trp-22, present in S-cytochrome b_2 core. The latter is 98% quenched on the holo form but still 90% quenched on fresh samples of the apo form prepared by the classical acid/acetone procedure. However, this apo form changes by aging (after several days at 4 °C) towards a more open structure with less quenching (70%) [16].

Trp-2, the second residue of H-cytochrome core can, therefore, have its proper $\bar{q}/q_{free}$ value calculated from mean value for Trp-1 + Trp-2, and supposed values for Trp-1. It is the major emitting species in the holo-H-cytochrome b_2 core.

Trp-3 similarly can have its $\bar{q}/q_{free}$ value calculated from mean values for Trp-1 + Trp-2 + Trp-3 and experimental values for Trp-1 + Trp-2. Its contribution to the total emission of holo-α is probably 75%.

Trp-4 pertains to β, which possibly also contains another tryptophan, Trp-5.

The results of such estimations are presented in Table 4. The more valuable data are those concerning the holo forms in neutral buffer without urea, since value taken for Trp-1 is most certainly correct under such conditions. Values of $\bar{q}/q_{free}$, equal to approximately 0.13 ± 0.06 and 0.9 ± 0.4 respectively for Trp-2 and Trp-3, indicate that, within α, the former is largely but not intensely quenched by heme and the latter not significantly. In 4 M urea holo α keeps a similar structure, since Trp-1, Trp-2 and Trp-3 all keep their $\bar{q}/q_{free}$ value practically unchanged.

If we now consider the apo form of the n 'globular' moiety of α, we see that it actually keeps a globular folding in the absence, but not in the presence of 4 M urea; there is no important quenching of Trp-2 in the absence of heme.

Trp-4 (or Trp-4 + Trp-5 if β actually contains two Trp residues) is markedly unfolded in 4 M urea ($\lambda_{max\ 350\ nm}$). When diluted 1/10 from 4 M urea in neutral buffer (giving a protein concentration of 0.5 mg/ml), the emission peak of β samples is rapidly shifted to 330 nm with no change of the quantum yield. A hydrophobic environment is thus restored and these diluted samples remain transparent when kept for several hours at 20 °C. Alternatively, if isolated β is submitted to the standard renaturing dialysis at a concentration close to 5 mg/ml, with 2-mercaptoethanol, the solution becomes highly turbid and precipitates. The precipitate can be redissolved in 1.5 M urea but not by modification of the pH and/or the ionic strength. There probably exist on β unmasked hydrophobic areas favouring unspecific aggregation at high concentration. The precipitate is not formed when α is present during renaturation, at a concentration higher than that of β.

DISCUSSION

Studies of the Folding of the Three Globules in H-Flavocytochrome b_2

Many renaturation studies in the last ten years concern the detection of intermediates in the folding process of proteins after more or less exhaustive unfolding by denaturing agents. As far as polyglobular proteins are concerned, one problem was to find out

whether or not the folding of each globular domain required interactions with the adjacent domains before the final phase in which both domains come into close contact [9,10]. Another problem was to understand how the association of several different subunits or domains allowed the formation of functional sites which are undetectable in any of the isolated domains (for example for coenzyme binding [14,39]).

In the case of H-flavocytochrome b_2 we tried to obtain information on the following points: first, whether the folding of each globule n, x and β (cf. Fig. 1) requires the presence of the two others; secondly, whether one of the globules carries the flavin-binding site; thirdly, in case of a negative answer to the second question: what kind of globule association is required to create the flavin site?

The criteria we used to distinguish 'denatured' segments and 'globular' segments are classical: (a) a hydrodynamic parameter, which is a function of the shape of the polypeptide chain and of the amount of hydration water, the frictional coefficient f/f_0, in the range 1 – 1.3 for globular proteins, (b) absorbance spectra in the 400 – 600-nm range, which give information on the integrity of the heme-binding site, (c) parameters of fluorescence of tryptophanyl residues. In addition to the classical parameters, wavelengths of maximal excitation and emission, we used a very versatile parameter $(F_{sol}/F_{gua})_\lambda$ (unpublished results), from which the (mean) quantum yield of tryptophan residues in a protein species relative to that of free tryptophan, the ratio $\bar{q}/q_{free}$, can be calculated. In denatured segments we expect a value for tryptophan $\bar{q}/q_{free}$ approximately equal to 1 with $\lambda_{max,\ emission}$ near 350 nm [40]. With globular segments and a hydrophobic environment, λ_{max} usually lies near 330 nm with $\bar{q}/q_{free}$ values close to 0.5 [42] and occasionally reaching 0.02 when internal quenching takes place [16]. For tryptophan residues in a folded unit, but in contact with water, λ_{max} is near 340 nm with $\bar{q}/q_{free}$ close to 1 [40 – 43] but reaching 2.5 in bovine serum albumin [40,41].

Conformational and Quaternary Structure of Isolated Fragments and Reconstituted Assembly

The structural parameters of the various samples were examined as described above, first under the initial denaturing conditions (where separation of α and β was achieved, that is in 4 M urea) and after renaturation either by 1:10 dilution, or a long standard dialysis in the presence of 2-mercaptoethanol.

Firstly, previous data showed that the globule n, which originates from S-flavocytochrome b_2, the cytochrome b_2 core, is totally resistant to proteases, and is a 'cytochrome b_5-like', very stable and rigid entity [15 – 21]. All the visible absorbance and electron paramagnetic resonance parameters concerning the bound heme are identical in the core, isolated α and the whole enzyme [17,44]. The idea that the core conformation is not dependent on the presence of the other part of the chain is also supported by the cross-reactivity of anticore antibodies with intact and nicked S-flavocytochrome b_2 [45].

As shown here, the H-flavocytochrome b_2 core (that contains two tryptophan residues instead of one for its *Saccharomyces cerevisiae* homologue) is also a stable protein entity, which even in 4 M urea keeps its typical absorbance visible spectrum unchanged (identical to that of isolated α_H and of the undenatured enzyme) and parameters of tryptophan fluorescence typical of a globular protein. The 'globule' x (cf. Fig. 1) also seems to have a stable, folded structure, which is conserved in 4 M urea (Table 4).

In spite of the fact that in the theoretical case of random angular distribution of the b_2 heme and indol planes, the critical distance for a half-quenching is 4.5 nm [46], the single tryptophan residue of x is not significantly quenched by the fixation of the heme to globule n, within the α assembly. This suggests a particular topology of the n-x assembly, which could agree with two kinds of models. Either x could extend from the core although attached by the hinge region 'cd', or the relative orientation of the two rings could be approximately perpendicular. In either case the 'biglobular' α_H assembly behaves as a stable, folded protein entity, which does not carry the area implicated in the interprotomer association, since it remains monomeric, with a frictional ratio of 1.34 (Table 2) at high ionic strength, under conditions where the undenatured and nicked flavocytochromes are tetrameric.

Parallel studies on β indicate that this fragment has no detectable residual folding in 4 M urea ($\lambda_{max,\ emission}$ at 350 nm) and becomes more globular just after urea dilution, forming a hydrophobic environment (peak at 330 nm) for its tryptophan(s). Its insolubility, when slowly renatured at a high concentration, is probably due to hydrophobic areas unmasked by the separation from α and resulting in unspecific aggregation. It is likely that specific binding sites involved in the stability of the tetramer association are in β. It should be noted that with the homologous S-flavocytochrome b_2 the situation is the opposite, the specific area for strong homologous associative interaction pertaining to x and not to the β globule [14].

Under conditions of low ionic strength, where the undenatured enzyme was shown to dissociate rapidly into monomers at 20 °C [36], the nicked enzyme seems to dissociate further, at least partially, into monomeric α and β molecules. However, we did not observe monomerisation of isolated β under these conditions.

These data lead to the conclusion that isolated α (that retains an important folding in 4 M urea) and β domains, recover, after their renaturation, features

characteristic of native globular proteins. As is always the case it is not possible to prove that the conformation recovered is precisely identical to that in the $\alpha\beta$ original assembly. We can only affirm that our results are not in contradiction with the hypothesis that both domains α and β are able to recover their proper folding independently.

Location of the Flavin Binding Site

All the studies previously carried out in our laboratory on various S-deflavocytochrome b_2 samples have shown that flavin is able to bind rapidly to the deflavo forms obtained by acid treatment, but not to those resulting from urea or guanidine treatments. Similar observations were made with lipoamide dehydrogenase, which requires several hours and dithiothreitol for maximum reactivation after guanidine dilution [47]. From that point of view, the stability of flavin sites appears markedly different from that of heme sites.

When deflavo samples of the nicked *Hansenula anomala* enzyme obtained in 4 M urea are submitted to a long standard dialysis with added FMN (renaturing treatment) binding yields of flavin are currently near 50–70% and reach 100% when disulfide reducing reagents are present (Table 1). Similar yields are obtained for the 'reconstituted' nicked enzyme obtained by a equimolar mixture of α and β before renaturation. The absence of disulfide-reducing agents leads to a marked alteration of renaturation yields, as is frequently observed when incorrect disulfide bridges are formed.

The most important fact is that with isolated α and β domains, even when they are at high concentrations, a similar renaturing treatment (in the presence of flavin and 2-mercaptoethanol) does not lead to any detectable flavin binding. The precision concerning the maximal detected amount of bound flavin indicates that, if the flavin site were nevertheless present on one of the fragments, its dissociation constant could be higher than 10 mM (at least 10^5 times that of the nicked or intact enzymes, $K_d \approx 0.1$ μM). The evidence for β is less convincing than for α, because of the precipitated state of the resulting material, which nonetheless does not contain any flavin.

The present study of the *H. anomala* enzyme therefore shows that the simultaneous renaturation of α and β leads to a functional folding of the flavin site, while none of the fragment is able to bind flavin when renatured alone. Similar conclusions, indicating a cooperativity of α and β for the formation of flavin-binding sites, have already been suggested for the *S. cerevisiae* enzyme [14]. A study of the flavin-binding capacity of a series of fractions containing variable ratios of α,β, obtained by molecular sieving of the nicked S-flavocytochrome b_2 in 6 M guanidine-HCl, indicated that after renaturation flavin binding on isolated fragments was lower than 3% while a 40% yield was obtained for equimolar mixtures. It should be underlined that for the *H. anomala* enzyme (Table 1) as well as for the *S. cerevisiae* enzyme, the flavin rebound to $(\alpha\beta)_4$ is completely functional: the molecular activity per bound flavin is not significantly different for the initial and reconstituted nicked forms. In fact, further studies demonstrating the integrity and functionality of flavin sites after separation of the cytochrome cores showed that only ε and β globules appear to be essential in this context [5, 6].

Is this flavin site stable on isolated monomers? The answer appears to be yes. Indeed Baudras [36] concluded that, after treatment at low ionic strength which yields the monomer form of the *H. anomala* enzyme, the flavin remains bound. Preliminary studies with the nicked enzyme submitted to the same treatment indicated a rapid release of part of the flavin, a significant amount of flavin, nevertheless, remaining in the bound state. A decrease in the affinity constant of one order of magnitude after monomerization could explain these data but it is also possible that a partial dissociation of $\alpha\beta$ into α plus β under such conditions (as suggested by sedimentation studies Table 2) is correlated with a partial release of flavin.

In the hypothetical model, proposed to explain the cooperativity of ε and β in the formation of flavin-binding site (Fig. 1), the isoalloxazine ring of FMN was tentatively placed in the crevice formed at their interface. It is possible to imagine that the Rossman fold forming the mononucleotide binding site could involve two loops 'β sheet, α helix' pertaining to two different domains. However, this is pure speculation and other explanations might be equally valid. All the residues involved might be located in one globule as in flavodoxin, but require the presence of the other to find the correct conformation. If such were the case, the isoalloxazine site should be close to the interface, as in glutathione reductase [48] or as in mononucleotide sites in several enzymes [49–51]. If, for example, α carried the essential group for flavin binding, β could also act as the external group (tryptophan or tyrosine), which in flavodoxins provides a hydrophobic environment for the pyrimidine part of the isoalloxazine ring but allows contact of benzenoid methyl 7 and 8 with water [52, 53]. It is most probably through this exposed aromatic edge of flavin that external electron carriers, in particular the prosthetic heme of cytochromes or NAD, can exchange electrons.

With the flavin site in such a sandwiched position, it is possible to build a model of a compact assembly between flavocytochrome b_2 and cytochrome c, in which both distances (a) from heme b_2 to flavin and (b) from heme b_2 to heme c, could be compatible with a direct electron transfer from the donor to the acceptor prosthetic groups (Capeillère-Blandin, unpublished

results). Theoretical predictions based on the vibrationally coupled tunneling theory [55, 56] lead to an appreciation of edge-to-edge distances of 0.8 – 1.5 nm between hemes *c* and b_2, taking into consideration the experimental parameters determined in our laboratory (Capeillère-Blandin, unpublished results). We may be justified in assuming that a similar distance of 0.8 – 1.5 nm between flavin and heme b_2 edges, with a correct relative position, would be compatible with observed values for transfer between the flavin and heme b_2 within H and S-flavocytochromes b_2 ($k = 300\ s^{-1}$ at 5 °C) [22] (and Capeillère-Blandin and Bray, 1978, personal communication).

CONCLUSION

The two former studies [5, 14], this and that of Gervais and Tegoni [6] concerning the structural properties of H and S-flavocytochrome b_2 molecules cleaved by proteases either in zone 'a' (yielding fragments α and β) or in 'a' and 'd' (yielding fragments n, x and β) allow us to draw a general conclusion.

Firstly, after a single cleavage of the chains of both *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala* enzymes (present study) the flavin site exists only on the $\alpha\beta$ assembly and not on isolated α and β fragments. Secondly, after two cleavages of the chains (again of both enzymes), the flavocytochrome molecule breaks down into a flavodehydrogenase entity $(x\beta)_4$ and a cytochrome entity (n). Thus the scheme previously proposed [5] and presented in Fig. 1 appears to account for all the structural properties of both enzymes. This result is of interest, since although these enzymes are evidently homologous, they have marked dissimilarities with respect to their kinetic parameters as well as a number of other features.

Our scheme, and in particular the position of the flavin site close to the $\alpha\beta$ interface, explains the alterations in the active site (marked decrease of the rate constant corresponding to electron transfer from bound lactate to flavin) resulting from the cleavage at locus 'a', the hinge between the α and β domains [11]. Such a cleavage might bring about a slight modification of the corresponding interface or alter the local charge distribution because of the appearance of new N and C-terminal groups.

We wish to thank Miss L. Naslin for the preparations of the *Hansenula anomala* flavocytochrome b_2, Mrs M. A. Thomas for her kind gift of the cytochrome b_2 core and Mrs M. O. Mosse for the analytical ultracentrifugation experiments. We are grateful to Mrs H. Costinesco and D. Lapointe for their precious help in preparing this manuscript and to Mrs M. Tegoni for interesting discussions.

REFERENCES

1. Labeyrie, F. & Baudras, A. (1972) *Eur. J. Biochem. 25*, 33 – 40
2. Jacq, C. & Lederer, F. (1972) *Eur. J. Biochem. 25*, 41 – 48.
3. Appleby, C. A. & Morton, R. K. (1954) *Nature Lond. 173*, 749 – 752.
4. Naslin, L., Spyridakis, A. & Labeyrie, F. (1973) *Eur. J. Biochem. 34*, 268 – 283.
5. Gervais, M., Groudinsky, O., Risler, Y. & Labeyrie, F. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 77*, 1543 – 1551.
6. Gervais, M. & Tegoni, M. (1980) *Eur. J. Biochem.* in the press.
7. Kirschner, K. & Bisswanger, H. (1976) *Annu. Rev. Biochem. 45*, 143 – 166.
8. Cohen, G. N. & Holzer, H., eds (1979) *Limited Proteolysis in Microorganisms* DHEW Publication (NIH) 79-1591, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
9. Goldberg, M. E. (1969) *J. Mol. Biol. 46*, 441 – 446.
10. Levitt, M. (1976) *J. Mol. Biol. 104*, 59 – 107.
11. Gervais, M., Risler, Y., Capeillère-Blandin, C., Vergnes, O. & Labeyrie, F. (1979) in *Limited Proteolysis in Microorganisms* (Cohen, G. N. & Holzer, H., eds) DHEW Publication (NIH) 79-1591, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
12. Gervais, M. (1976) Thèse de 3ème Cycle, Biologie Cellulaire, Univ. Paris-Sud Centre d'Orsay.
13. Guiard, B., Lederer, F. & Jacq, C. (1975) *Nature (Lond.) 255*, 422 – 423.
14. Mével-Ninio, M., Risler, Y. & Labeyrie, F. (1977) *Eur. J. Biochem. 73*, 131 – 140.
15. Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y. & Naslin, L. (1966) *Biochim. Biophys. Acta, 128*, 492 – 503.
16. Labeyrie, F., di Franco, A., Iwatsubo, M. & Baudras, A. (1967) *Biochemistry, 6*, 1791 – 1797.
17. Groudinsky, O. (1972) Doctoral Thesis, Paris.
18. Watari, H., Groudinsky, O. & Labeyrie, F. (1967) *Biochim. Biophys. Acta, 131*, 592 – 594.
19. Keller, R., Groudinsky, O. & Wuthrich, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta, 328*, 233 – 238.
20. Guiard, B., Groudinsky, O. & Lederer, F. (1974) *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 71*, 2539 – 2543.
21. Guiard, B. & Lederer, F. (1976) *Biochimie (Paris) 58*, 305 – 316.
22. Capeillère-Blandin, C., Bray, R. C., Iwatsubo, M. & Labeyrie, F. (1975) *Eur. J. Biochem. 54*, 549 – 566.
23. Forestier, J. P. & Baudras, A. (1971) in *Flavins and Flavoproteins* (Kamin, H., ed.) pp. 599 – 605, University Park Press, Baltimore.
24. Iwatsubo, M., Mével-Ninio, M. & Labeyrie, F. (1977) *Biochemistry, 16*, 3558 – 3566.
25. Labeyrie, F., Baudras, A. & Lederer, F. (1978) *Methods Enzymol. 53*, 238 – 256
26. Iwatsubo, M. & di Franco, A. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol. 47*, 891 – 910.
27. Wassink, J. & Mayhews, S. (1975) *Anal. Biochem. 68*, 609 – 616.
28. Pajot, P. (1976) *Eur. J. Biochem. 63*, 263 – 269
29. Mével-Ninio, M., Pajot, P. & Labeyrie, F. (1971) *Biochimie (Paris) 53*, 35 – 41.
30. Hogness, T. R., Zscheile, F. P., Jr, Sidwelle, A. E., Jr & Barron, E. G. S. (1937) *J. Biol. Chem. 118*, 1 – 14
31. Pajot, P. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 45*, 887 – 892.
32. Weber, K. & Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem. 244*, 4406 – 4412.
33. Douglas, M. G., Finkelstein, D. B. & Butow, R. A. (1979) *Methods Enzymol. 56*, 58 – 66.
34. James, G. T. (1978) *Anal. Biochem. 86*, 570 – 571
35. Shapiro, A. L., Viñuela, E. & Maizel, R. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 28*, 815 – 820
36. Baudras, A. (1973) in *Dynamic Aspects of Conformation Changes in Biological Macromolecules* (Sadron, S., ed.) pp. 181 – 205, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.
37. Elias, H. G. (1964) in *Méthodes de l'Ultracentrifugation Analytique* (Beckman®, Instruments International S.A., Genève, eds) 3nd ed., French translation, p. 302.

38. Monteilhet, C. & Risler, J. L. (1970) *Eur. J. Biochem. 12*, 165–169.
39. Reference deleted.
40. Hogberg-Raibaud, A. & Goldberg, M. E. (1977) *Biochemistry, 16*, 4014–4020.
41. Teale, F. W. J. (1960) *Biochem. J. 76*, 381–388.
41a. Weber, G. & Young, L. B. (1964) *J. Biol. Chem. 239*, 1424–1431.
42. Burstein, E. A., Vedenkina, N. S. & Ivkova, M. N. (1973) *Photochemistry and Photobiology, 18*, 263–279.
43. Chen, R. F., Edelhoch, H. & Steiner, R. F. (1969) in *Physical Principles and Techniques in Protein Chemistry, Part A* (Leach, S. J., ed.) pp. 171–244, Academic Press, New York.
44. Pajot, P. & Groudinsky, O. (1970) *Eur. J. Biochem. 12*, 158–164.
45. Guiard, B. & Lederer, F. (1976) *Eur. J. Biochem. 65*, 537–542.
46. Risler, J. L. (1971) *Biochemistry, 10*, 2664–2669.
47. Moore, E. G., Cardemil, E. & Massey, V. (1978) *J. Biol. Chem. 253*, 6413–6422.
48. Schulz, G. E., Schirmer, R. H., Sachsenheimer, W. & Pai, E. F. (1978) *Nature (Lond.) 273*, 120–124.
49. Rossman, M. G., Liljas, A., Bränden, C. E. & Banaszak, L. J. (1975) in *The enzymes* (Boyer, P., ed.) 3rd edn, vol. 11 pp. 61–101, Academic Press, New York.
50. Kasvinsky, P. J., Madsen, N. B., Sygusch, J. & Fletterick, R. J. (1978) *J. Biol. Chem. 253*, 3343–3351.
51. Monaco, H. L., Crawford, J. L. & Lipscomb, W. N. (1978) *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75*, 5276–5280.
52. Burnett, R. M., Darling, G. D., Kendall, D. S., LeQuesne, M. E., Mayhew, S. G., Smith, W. W. & Ludwig, M. F. (1974) *J. Biol. Chem. 249*, 4383–4392.
53. Watenpaugh, K. D., Sieker, L. C. & Jensen, L. H. (1973) *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 70*, 3857–3860.
54. Reference deleted.
55. Hopfield, J. J. (1974) *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 71*, 3640–3644.
56. Potasek, M. J. & Hopfield, J. J. (1977) *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74*, 229–233.

M. Gervais, F. Labeyrie, and Y. Risler, Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

O. Vergnes, Laboratoire de Biochimie, Université Claude-Bernard, 43 Boulevard du 11-Novembre 1918, F-69621 Villeurbanne, France

DISCUSSION CHAPITRE II

Dans l'article précédent, nous avons abordé le problème de la localisation du site flavinique sur le H-flavocytochrome b_2. La meilleure hypothèse résultant de ce travail est qu'une conformation de ce site permettant la fixation efficace de la flavine (Kd < 100 µM) n'est réalisée que si les deux fragments α et β' sont combinés dans le rapport 1/1. Notre conclusion par conséquent ne diffère aucunement de celle faite par Ninio et al. concernant le S-flavocytochrome b_2 mais nos données sont plus précises et plus convainquantes parce qu'il a été possible d'obtenir des réactivations de 100 % alors que les taux maxima étaient de 50 % avec l'enzyme S (221).

Il apparait donc que les ponts polypeptidiques "a" et "cd" sensibles aux protéases ont des propriétés différentes et ne jouent pas le même rôle dans la structure repliée. Le premier est un pont intra domaine fonctionnel : il relie les deux globules α et β'(2 et 3) dont chacun est essentiel à la fixation du coenzyme flavinique. Le second ("cd"), dont la coupure provoque la séparation spontanée d'un cytochrome et d'une flavodéshydrogénase est un pont inter domaine fonctionnel.

Deux questions se posent a) peut-on imaginer les mécanismes par lesquels ces deux fonctions se sont trouvées associées sur une même chaîne polypeptidique ? b) la conformation biglobulaire de la partie flavodéshydrogénase et l'interaction particulière du FMN avec ces deux globules se retrouvent-elles chez d'autres flavoprotéines ?

1 - Mode d'association des fonctions cytochrome et flavodéshydrogénase dans le flavocytochrome b_2.

Bien que d'autres mécanismes tel celui des insertions intragéniques (405), ou celui de la fusion des chaînes polypeptidiques (406, 407) soient théoriquement susceptibles de rendre compte de l'existence de protéines multi-fonctionnelles, l'un de ceux qui ont été le plus invoqués est celui de la fusion de gènes codant initialement pour des entités monofonctionnelles séparées (408).

Initialement l'hypothèse de fusion de gènes semble avoir été proposée dans le cas de certaines protéines pour tenir compte de la répétition de séquences d'acides aminés homologues sur une même chaîne polypeptidique. Les cas les plus représentatifs sont sans doute à cet égard ceux des γ_G immunoglobulines (409, 410), des serum albumines (411,412) ou de la β galactosidase (413).La même hypothèse de fusion de gène fut également proposée par certains auteurs pour tenir compte du fait que, chez certains microorganismes plusieurs fonctions, qui chez d'autres espèces étaient portées par des espèces moléculaires distinctes, se trouvaient

associées à une chaîne polypeptidique unique (414-416). Dans quelques systèmes où deux fonctions sont portées, chez la souche sauvage, par des enzymes distincts, il a été de fait possible d'isoler des mutants ayant réalisé l'association de ces fonctions sur une même chaîne protéique à la suite d'une fusion de gènes (417-419). Des études visant à comparer les propriétés des enzymes fusionnés à celles des enzymes initiallement monofonctionnels ont été entreprises (420).

De façon routinière, l'hypothèse de fusion de gènes est maintenant souvent proposée lorsque des expériences de protéolyse ou l'examen d'une structure tridimensionnelle mettent en évidence la présence de plusieurs globules au sein d'une protéine, l'hypothèse de base étant que ces structures compactes ont conservé dans l'enzyme fusionné, le repliement indépendant qui était le leur ancestralement. Ainsi est-ce le cas pour les protéases acides (373), la pyruvate kinase (421), le composant II du complexe anthranilate synthetase-phosphoribosyltransférase de certains organismes (415,416) etc.

Deux remarques à ce propos méritent dêtre faites :

1 - Dans le cas d'une protéine pour laquelle l'hypothèse d'une fusion de gènes est fortement justifiée, une zone de la chaîne polypeptide hypersensible à l'action de protéases n'est pas obligatoirement la trace, au niveau de la protéine, d'une telle fusion. Ainsi la liaison peptidique 306-307 de la serum albumine bovine, coupée de façon unique par la pepsine (422) n'a aucun rapport avec les limites des 3 domaines homologues issus d'un processus de replication-fusion qui sont respectivement les domaines 1-190, 190-382 et 383-581 (411).

2 - L'absence de détection de domaines compacts, globulaires ne préjuge en rien de l'éventualité d'une ancienne fusion de gènes, des réarrangements importants du repliement de la chaîne polypeptidique ayant eu la possibilité d'intervenir ultérieurement.

Dans le cas du flavocytochrome b_2, l'hypothèse selon laquelle cet enzyme complexe pourrait résulter d'une fusion de gènes était de fait fondée sur la résistance des fragments α et β' à la protéolyse (169). La localisation du site de fixation de l'hème sur le fragment α (174) et l'hypothèse selon laquelle β pourrait porter le site flavinique avait conduit Naslin et coll. à proposer qu'une telle fusion aurait donc pu avoir lieu entre des gènes codant initialement pour un cytochrome et une flavoprotéine (179). Guiard et coll. n'hésitèrent pas à parler de la fusion de gènes "portant l'information pour chaque fonction" (186).

Dans ces différentes variantes de la même hypothèse, c'est la zone "a" accessible aux protéases de levure chez l'enzyme S (187) et à la trypsine dans l'enzyme H (179) qui était considérée comme la trace de cette fusion de gènes au niveau de la chaîne polypeptidique. S'il est effectivement possible que la zone "a" soit la trace "protéique" d'une fusion de gènes, le travail que nous venons d'exposer concernant l'enzyme H (article I et article III) comme celui de Ninio et coll. sur l'enzyme S montrent que ce n'est pas cette fusion qui aurait eu pour conséquence d'associer les deux fonctions cytochromique et flavodéshydrogénase sur une même chaîne polypeptidique. Par contre, si la trace d'une telle fusion existe, la zone "cd" semble être un excellent candidat pour la représenter. Les arguments en faveur d'une telle hypothèse sont de 3 ordres :

1) le site de la flavine requiert la présence simultanée des fragments α et β' et semble présent à l'interface $\varepsilon\beta'$.

2) La séparation d'α et de β' après coupure dans la région "a", nécessite la présence d'agents dissociants (171,221 et articles III et IV) tandis que celle du noyau cytochromique "n" de la flavoprotéine $\varepsilon\beta'$ résultant de la coupure dans la zone "cd" se fait spontanément en tampon usuel (article I, II et V)

3) Un élément cytochromique homologue du noyau cytochromique b_2 se trouve associé dans d'autres organismes et dans d'autres systèmes à des oxidoréductases non homologues à priori . L'exemple extrême est celui du système cytochrome b_5 réductase / cytochrome b_5 dans lequel l'élément cytochromique, le cytochrome b_5, est une protéine autonome de faible poids moléculaire (16 700 daltons) (423). Dans le cas de la sulfite oxidase, déjà évoqué, l'élément cytochromique homologue -le noyau sulfite- est lié covalemment à une molybdeno réductase mais son poids moléculaire est également voisin de celui du noyau cytochromique b_2 (424). A ce titre le noyau cytochromique b_2 peut être considéré comme un cytochrome élémentaire.

On ne peut pas dire que l'altération fonctionnelle observée lors de la coupure dans la zone "a" soit un quatrième argument en faveur de la nouvelle hypothèse car on connait des cas où un système bifonctionnel composé de deux enzymes distincts diffère, par son comportement cinétique, du même système dans lequel les deux fonctions se sont trouvées associées covalemment à la suite d'une fusion de gènes (420).

A ma connaissance l'hypothèse selon laquelle la zone "cd" constituerait la trace de la fusion de gènes ayant eu pour conséquence d'associer les deux fonctions sur une même chaine polypeptidique a été proposée pour la première fois en 1976 par moi-même (207). Cette hypothèse semble maintenant admise par une large majorité.

A la décharge des partisans de l'ancienne hypothèse il faut préciser trois points :

a) l'argument 1 ne pouvait être connu avant 1975, date à laquelle les premières informations à ce sujet ont été disponibles (200).

b) l'argument 2 ne pouvait être utilisé avant 1972 en ce qui concerne la première moitié (nécessité d'agents dissociants)(171) et avant 1975 en ce qui concerne sa seconde moitié (dissociation spontanée des deux fonctions (198).

c) en ce qui concerne le troisième argument, on conçoit qu'il n'ait pu être invoqué avant 1973. En effet, bien qu'auparavant, des données comparées d'absorbance optique (122) de résonance paramagnétique électronique (135), de résonance magnétique nucléaire (176), de dichroïsme circulaire magnétique (184) aient suggéré une homologie structurale entre noyau cytochromique b_2 et cytochrome b_5, et qu'une possible homologie entre cytochrome b_5 et la partie cytochromique de la sulfite oxydase aie été discutée (424), leur origine ancestrale commune ne fut établie que par la mise en évidence de leurs homologies de séquences (175, 218, 240).

2 - Conformation du site flavinique

Une autre méthode que la protéolyse permet, lorsqu'elle est applicable, d'obtenir des informations à la fois sur l'architecture générale de la molécule et sur les structures particulières créant le site flavinique. Il s'agit de la technique de diffraction des rayons X.

Dans le cas du flavocytochrome b_2, les données cristallographiques ne sont encore que préliminaires (180,212,238). Par conséquent les seules informations dont nous disposons concernant la structure tertiaire sont celles acquises (voir chapitre I) par la méthode de protéolyse. Il est néanmoins possible de comparer ces données aux structures tertiaires connues pour d'autres flavoprotéines obtenues grâce à la technique de diffraction des rayons X ou grâce à des expériences de protéolyse.

A - Flavoprotéines dont la structure tridimentionnelle est connue

Nous disposons actuellement de peu de données cristallographiques sur les flavoprotéines. Cinq structures sont connues à haute résolution : trois de flavodoxines, une de glutathione réductase et une de p-hydroxybenzoate hydroxylase. Outre le flavocytochrome b_2, au moins trois autres protéines sont étudiées par cette méthode la glycollate oxidase, la ferrodoxine NADP oxidoréductase, et la lactate oxidase.

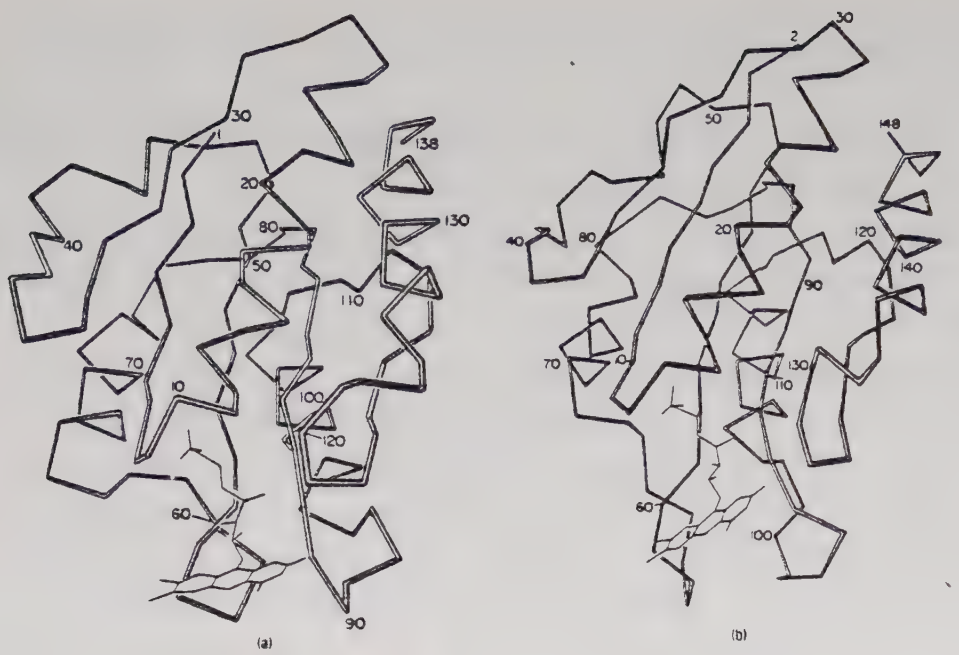

Figure 4 : Comparaison des structures tridimentionnelles des flavodoxines de Clostridium MP (a) et Desulfovibrio vulgaris (b) selon Mayhew et Ludwid (477).

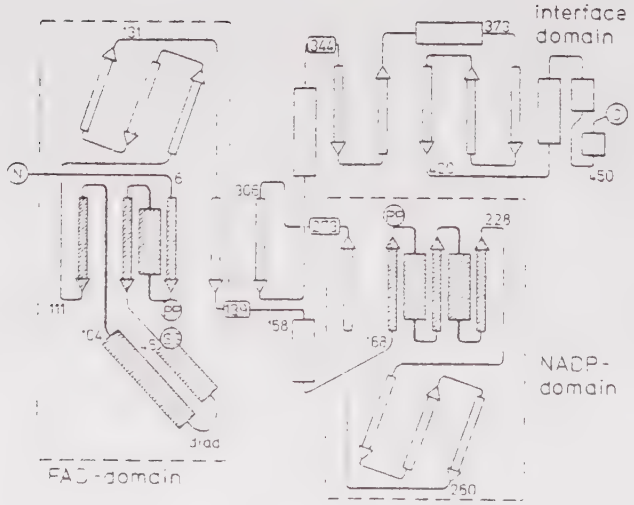

Figure 5 : Les trois domaines cristallographiques de la glutathione réductase selon Schulz et al (402).

1) Structure des flavodoxines

Les flavodoxines sont classées en deux groupes en fonction de certaines propriétés chimiques et physiques (425). Les structures tridimensionnelles d'un représentant de chacun de ces groupes, la flavodoxine de Desulfovibrio vulgaris pour le groupe "rubrum" et de Clostridium MP pour le groupe "pasteurianum" ont été déterminées (399-401). Il s'agit de flavodoxines à chaîne dite "courte" (148 et 138 résidus d'acides aminés respectivement). Nous n'entrerons pas dans le détail de la structure de la flavodoxine à chaine "longue" de Anacystis nidulans (426) qui se rapproche, en ce qui concerne le site flavinique de celle de D. vulgaris.

La figure 4 présente, pour chacune des deux flavodoxines considérées les contours de la chaîne polypeptidique ainsi que la localisation du site flavinique. Ces structures présentent un certain nombre de ressemblances et de différences. Au sens cristallographique du terme, les deux structures sont monoglobulaires. Bien que les séquences en acides aminés présentent de larges différences (400), l'architecture générale est la même : un feuillet β central dont les 5 brins sont reliés par deux paires d'hélices. Une telle structure est comparable à celle trouvée dans les déshydrogénases à NAD (367-370).

En ce qui concerne le site flavinique, qui est périphérique, la figure en donne une image très trompeuse en raison de la non représentation des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. En fait, le cycle isoalloxazine dans les deux cas est enfoui dans une poche dont un segment de la chaîne polypeptidique forme le fond et les chaînes latérales de deux acides aminés les côtés, un certain nombre de liaisons hydrogènes formées avec le cycle lui-même, la queue ribityl et le phosphate assurant la stabilité de l'ensemble(400).

Dans le détail, de façon locale un petit nombre de différences existent. Ainsi les côtés de la poche qui, dans l'enzyme de D.vulgaris (400) sont assurés par le tryptophane 60 et la tyrosine 98 sont chez l'enzyme de Clostridium MP (401) respectivement remplacés par la méthionine 59 et le tryptophane 90.

2) Glutathione réductase

C'est une protéine de haut poids moléculaire (2 x 50 000 daltons) de structure complexe.

L'étude cristallographique de cette protéine à 0,3 nm de résolution (402) a mis en évidence une organisation du repliement de la chaîne polypeptidique en 3 domaines (figure 5). L'un (le domaine d'interface) est impliqué dans le processus de dimérisation, le second dans la fixation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), le troisième dans la fixation du coenzyme flavinique qui dans cet exemple est un flavine adénine dinucléotide (FAD).

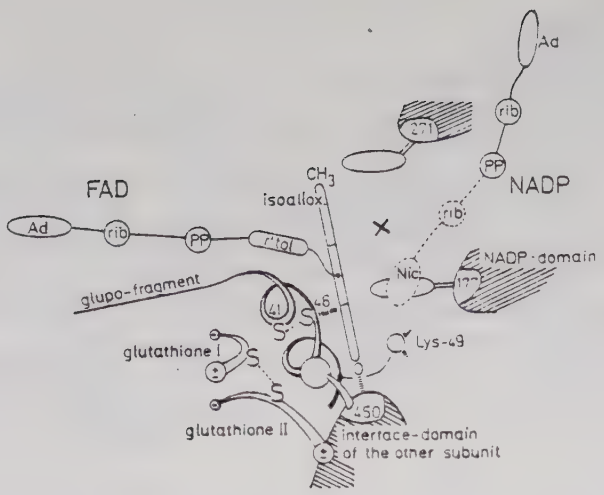

Figure 6 : Interactions du flavine adénine dinucléotide avec les différents domaines de la glutathione réductase selon Schulz et al. (402).

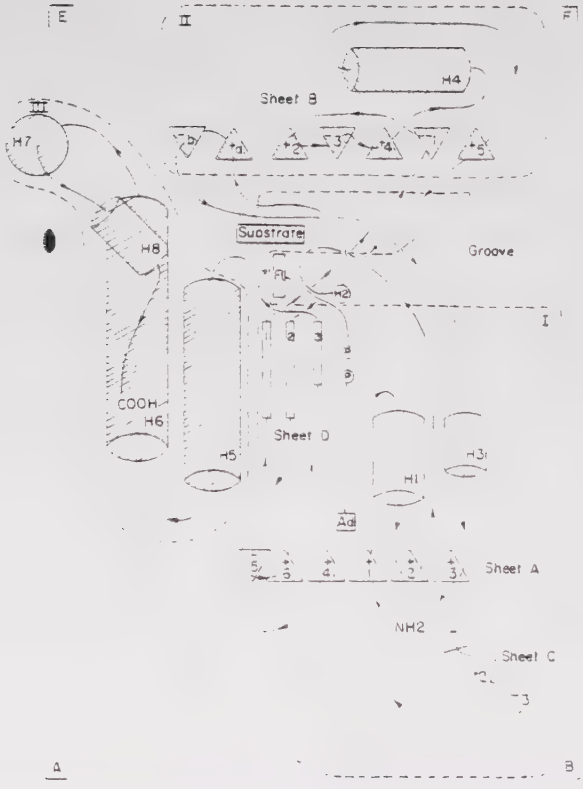

Figure 7 : Les trois domaines cristallographiques de la p.hydroxybenzoate hydroxylase selon Wierenga et al. (403).

Ce dernier domaine est constitué d'un feuillet β central à 3 brins parallèles reliés par des hélices. Un tel repliement est voisin de celui trouvé dans les déshydrogénases à NAD (367-370) et la flavodoxine (309-401). Il en diffère principalement par une boucle de grande taille située entre les résidus 45 et 104. Comme dans la flavodoxine, le coenzyme flavinique est localisé à la surface de la molécule mais les interactions de celui-ci avec la chaîne polypeptidique sont connues avec moins de précision que dans l'exemple précédent. La figure 6 montre la possibilité, pour le FAD, d'interagir non seulement avec son propre domaine mais également avec le domaine du NADP, auquel appartient le résidu 271, et le domaine interface d'une autre sous-unité (voir aussi ref 427). Le site flavinique est donc localisé à la limite de plusieurs domaines.

3) p-hydroxybenzoate hydroxylase (403, 428)

Comme celle de la glutathione réductase, la chaîne polypeptidique de cet enzyme est repliée en 3 domaines cristallographiques (figure 7). Un profond sillon, qui permet l'accès du site actif, partage la molécule en deux lobes. Le cycle isoalloxazine est niché au fond de ce sillon, au point de contact des trois domaines et interagit avec chacun d'eux. Il est encadré par deux hélices α situées perpendiculairement à son axe longitudinal dans des plans parallèles à son propre plan. La localisation du NADP n'est pas précisée. La meilleure hypothèse proposée par ces auteurs est qu'il se fixe dans le sillon situé entre le cycle du FAD et l'hélice H5.

4) Glycolate oxidase

La structure de cette flavoprotéine n'étant connue que partiellement et à faible résolution il n'est actuellement pas possible d'en tirer des renseignements concernant le site flavinique. Seule est actuellement déterminée sa composition en deux domaines (429).

5) ferredoxine NADP oxidoreductase (404)

Hormis, paradoxalement la conformation du coenzyme flavinique, peu d'éléments sont actuellement disponibles concernant cette flavoprotéine.

6) lactate oxidase

L'étude de cet enzyme par diffraction des rayons X n'en est qu'à ses débuts (430).

B - Flavoprotéines ayant subi des protéolyses

L'exemple de la cytochrome b_5 réductase (E.C.1.6.2.2) enzyme flavoprotéique qui catalyse la réduction du cytochrome b_5 par le NADH, me semble particulièrement éloquent. Cet enzyme de poids moléculaire 40 000 possède les sites nécessaires à la fixation du NADH, du flavine adénine dinucléotide (FAD) et du cytochrome b_5. Strittmatter et coll. (431) ont montré que l'holoenzyme pouvait subir une trypsinolyse ménagée résultant en la formation de deux fragments T_1 (18-22 000 daltons) et T_2 (8 500 daltons) résistant à une coupure ultérieure malgré leur potentialité (présence de résidus lysines et arginines) de subir une telle coupure. Malgré la perte d'environ 47 résidus d'acides aminés par rapport à l'enzyme natif, l'enzyme T (T = trypsinolysé) conserve la capacité de fixer FAD, NADH et cytochrome b_5 et une activité, bien que certains paramètres cinétiques (K_m NADH et K_m cytochrome b_5 en particulier) soient modifiés. Les deux fragments T_1 et T_2 sont fortement associés et ne peuvent être séparés que dans des conditions dénaturantes (urée 7 M). Ni l'un ni l'autre seul n'est capable de créer une conformation correcte du site de la flavine dont la fixation nécessite la présence simultanée des deux.

C - Comparaisons avec le flavocytochrome b_2

Nous avons montré (Article I et II) que la partie flavodéshydrogénase du flavocytochrome b_2 était formée de deux globules : ε (PM $\sim$18 000 daltons) et β' (PM $\sim$22 000 daltons). En raisonnant uniquement en terme de taille, il était raisonnable d'imaginer cependant que l'un d'entre eux aurait pu suffire à porter le site du FMN. L'exemple de certaines flavodoxines, monomères de poids moléculaire 16 000 (432), le montre. Dans l'article précédent, nous avons montré en fait que la présence simultanée des deux fragments ε et β' était nécessaire à la création de ce site. Ce résultat est le second exemple le premier étant celui de la NADH cytochrome b_5 réductase évoqué plus haut d'un site flavinique créé par l'association de deux globules.

Les données issues de la connaissance des structures tridimentionnelles ne concernent pas exactement le même aspect du problème. En effet, une structure tridimentionnelle est statique : elle décrit une situation sans préjuger de ce qu'elle deviendrait si une des parties du modèle se trouvait supprimée.

Pour la glutathione réductase et la p-hydroxybenzoate hydroxylase le site flavinique qui fait partie du site actif est situé au confluent de plusieurs domaines cristallographiques. Bien que ces images ne suffisent pas à évaluer la contribution critique jouée par chacun d'entre eux dans la stabilisation du complexe flavine-protéine on peut penser, comme le proposent Wierenga et coll. pour la p-hydroxybenzoate hydroxylase, que les domaines, en raison de l'importance de leurs interactions ne pourraient, isolés, être stables (403). Dans la

pratique cela se traduirait probablement par la nécessité de deux d'entre eux, voire même des trois pour fixer le FAD.

Dans le cas de la flavodoxine, protéine à un seul domaine cristallographique il est tentant de dire que la situation n'est pas du même type que celle trouvée dans le flavocytochrome b_2. Il faut néanmoins bien garder présent à l'esprit que les données relatives à chacun des enzymes ne sont pas directement comparables puisque dans un cas la notion de domaine est cristallographique et dans l'autre elle est protéolytique.

En fait si on étudie plus en détail le site de fixation du FMN dans la flavodoxine de D.vulgaris comme l'ont fait Watenpaugh et coll. (400) on s'aperçoit que les résidus de la chaîne polypeptidique formant des liaisons hydrogène avec le coenzyme flavinique, sont localisés dans la séquence en des endroits très éloignés (citons par exemple les résidus 10, 15, 59, 94, 102, 129). Il est alors permis d'imaginer que si par une protéase très bien choisie on arrivait à couper la chaîne polypeptidique dans la boucle 60-65 (voir figure 4), les 2 fragments ainsi formés resteraient associés et ni l'un ni l'autre isolé ne serait capable de fixer le FMN avec une forte affinité. Dans ce cas de figure, qui, je le répète, est purement hypothétique, on ne manquerait alors pas de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour les fragments ε et β du flavocytochrome b_2.

En définitive, même si l'on fait abstraction de la dernière hypothèse il semble bien que les flavoprotéines complexes soient constituées de plusieurs domaines créant à leur interface le site actif.

Dans le cas du flavocytochrome b_2, la contribution du troisième globule (n) à la stabilisation de ce site actif n'est pas connue. En tout cas, celui-ci n'est pas essentiel à l'activité lactate-ferricyanure déshydrogénase,ainsi nous le verrons plus en détails dans le chapitre suivant.

C H A P I T R E I I I

ETUDE DES PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DE DÉRIVÉS PROTEOLYTIQUES DU FLAVOCYTOCHROME B_2

ARTICLE IV : HOW THE LOSS OF SEVERAL RESIDUES, AT THE LEVEL OF ONE INTERGLOBULE JUNCTION, MODULATES THE LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY OF YEAST FLAVOCYTOCHROME B_2 : A STUDY OF THE NICKED ENZYMES RESULTING FROM CLOSTRIPAÏN AND TRYPSIN ACTION

GERVAIS, M., CORAZZIN, S. & RISLER, Y. (1982)
Biochimie, 64, 509-522.

ARTICLE V : PROTEOLYTIC CLEAVAGE OF HANSENULA ANOMALA FLAVOCYTOCHROME B_2 INTO ITS TWO FUNCTIONAL DOMAINS : ISOLATION OF A HIGHLY ACTIVE FLAVODEHYDROGENASE AND A CYTOCHROME B_2 CORE.

GERVAIS, M., RISLER, Y. & CORAZZIN, S. (1982)
soumis à Eur. J. Biochem.

INTRODUCTION CHAPITRE III

Lorsque l'on désire obtenir des informations sur un processus biologique quelconque, il est souvent beaucoup plus fructueux d'étudier comment et pourquoi ce processus peut être perturbé. Si, pour l'espèce humaine, l'étude de sujets "malades" se révèle ainsi particulièrement intéressante, on cherchera, pour d'autres espèces, à obtenir des "mutants". Lorsque, et c'est le cas pour le flavocytochrome b_2, on n'a pas la chance de disposer de mutants,il est classique d'induire des perturbations structurales par des moyens artificiels et de tenter de les relier à des modifications fonctionnelles.

Le terme de "structure" n'étant pas univoque, on peut aisément imaginer déjà que de nombreuses méthodes sont aptes à fournir ce type de données selon, en particulier que l'on veuille modifier la structure primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire d'une protéine.

De façon quelque peu arbitraire, je classerai plutôt ces méthodes en deux grands groupes :

a) celles ne modifiant pas la structure polypeptidique de la chaîne.

b) celles qui modifient cette structure.

Sans entrer dans le détail des nombreuses méthodes s'inscrivant dans le premier groupe, j'en citerai simplement de deux types : d'une part celles qui font intervenir une modification chimique et d'autre part celles qui concernent l'étude du dépliement ou du repliement.

Pour ce qui est du second groupe le choix est moindre puisqu'il n'y a que deux façons de rompre une liaison peptidique : l'une est chimique, l'autre est enzymatique. Les analogies entre ces deux façons sont d'ailleurs très grandes. Elles concernent principalement :

- la spécificité :

En effet, que l'agent utilisé soit une protéase (286,433) ou un agent chimique (433) la spécificité peut être restreinte.

- l'influence de la conformation de la protéine :

L'efficacité de la coupure dépendra en fait énormément de l'accessibilité des sites correspondant à la spécificité de l'agent coupant.

En dépit de ces ressemblances les deux méthodes ne sont pas également utilisables. La coupure chimique nécessite en effet souvent des conditions expérimentales drastiques (température, pH) qui risquent de perturber de façon irrémédiable l'activité de la protéine. Pour cette raison ce type de méthodesest

préférentiellement utilisé -parmi d'autres- pour la séquence de protéines qui ne requiert pas l'obtention de fragments repliés dans une conformation native. Au contraire la variété très grande des protéases et les conditions "souples" de leur emploi en font un outil théoriquement très puissant. La non commercialisation de la plupart des plus spécifiques limite cependant actuellement la possibilité de développement de cette voie d'étude.

Nous avons choisi cette dernière technique pour aborder les problèmes de relation structure-fonction dans le flavocytochrome b_2. Le travail présenté dans ce chapitre concerne tout particulièrement les effets fonctionnels de différentes coupures protéolytiques localisées dans les deux ponts polypeptidiques aa' et cd qui, dans l'enzyme natif, relient entre eux les trois globules n, ε et β'. Ce travail a été entièrement effectué sur le H-flavocytochrome b_2.

Dans l'article IV est étudiée la corrélation entre les coupures protéolytiques induites par deux protéases différentes à divers loci de la même zone intrafonctionnelle "a" et la modulation de l'activité moléculaire.

Dans l'article V est décrite une entité flavodéshydrogénase obtenue après coupure protéolytique du flavocytochrome b_2 dans la zone interfonctionnelle "cd" à l'exclusion de toute autre coupure dans la zone "a".

Ces résultats sont comparés et discutés avec ceux obtenus (article I) pour la flavodéshydrogénase trypsique (FDH_T).

BIOCHIMIE, 1982, 64, 509-522.

How the loss of several residues, at the level of one interglobule junction, modulates the lactate dehydrogenase activity of yeast flavocytochrome b_2: a study of the nicked enzymes resulting from clostripain and trypsin action.

Michel GERVAIS ◇, Sylvie CORAZZIN and Yanick RISLER.

Laboratoire d'Enzymologie Physicochimique, Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire propre associé à l'Université Pierre et Marie Curie, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

(*Reçu le 5-05-1982, accepté le 26-05-1982*).

Résumé.

La chaîne native du flavocytochrome b_2 *est repliée en trois globules reliés entre eux par deux ponts polypeptidiques « a » et « cd » sensibles à l'action des protéases. Nous montrons dans ce travail que sous l'action de la clostripaine c'est la zone « a » du H-flavocytochrome* b_2 *qui est coupée en premier. Les deux fragments ainsi formés* (α_c *et* β_c) *sont homologues mais non identiques aux fragments* (α_T *et* β'_T) *obtenus par action de la trypsine. Les activités moléculaires des deux espèces résultantes* ($\alpha_c\beta_c$) *et* ($\alpha_T\beta'_T$) *ne représentent que 25 pour cent et 4 pour cent de l'activité de l'enzyme native. L'étude des propriétés catalytiques des espèces* ($\alpha_c\beta'_T$) *et* ($\alpha_T\beta_c$) *résultant de l'association croisée des fragments isolés montre que le fragment de type* β *joue un rôle critique dans ces perturbations fonctionnelles. La perte de six acides aminés à l'extrémité N-terminale de* β_c *semble être particulièrement dramatique à cet égard. Notre meilleure hypothèse est que ces acides aminés participent à la conformation correcte du site actif qui serait localisé dans la zone de contact entre* α *et* β. *Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents de ce laboratoire montrant que* α_T *et* β'_T *sont tous deux nécessaires à la création du site flavinique.*

Mots-clés : cytochrome / flavodéshydrogénase / domaines de protéolyse / relations structure-fonction.

Summary.

The native chain of flavocytochrome b_2 *is folded into three globules linked together by two protease-sensitive bridges « a » and « cd ». We show in this paper that zone « a » of H-flavocytochrome* b_2 *is the first to be cleaved under clostripain action. The* α_c *and* β_c *fragments thus formed are homologous to* α_T *and* β'_T *trypsic fragments. The remaining activities of the resulting* ($\alpha_c\beta_c$) *and* ($\alpha_T\beta'_T$) *forms are only 25 per cent and 4 per cent of the native flavocytochrome* b_2 *one. The study of the catalytic properties of* ($\alpha_c\beta'_T$) *and* ($\alpha_T\beta_c$) *species resulting from the crossed reassociation of the isolated fragments show that the* β *type fragment plays a critical role in the catalytic process. A dramatic activity decrease may be correlated with the loss of 6 amino acid residues at the N-terminal of* β_c. *Our best hypothesis is that these amino acids are involved in the active site, which may be located in the contact zone between* α *and* β. *These results are in agreement with previous results obtained in this laboratory which showed the necessity of both* α_T *and* β'_T *fragments for the correct conformation of the flavin binding site.*

Key-words : cytochrome / flavodehydrogenase / proteolysis domains / structure-function relationships.

Abbreviations :

H- *or S-flavocytochrome* b_2 : *flavocytochrome* b_2 (*L-lactate cytochrome* c *oxidoreductase* : EC. 1.1.2.3) *extracted from* Hansenula anomala *or* Saccharomyces cerevisiae *yeasts respectively.* α_c, β_c, α_T, β'_T : *proteolytic fragments of* H-*flavocytochromme* b_2 (*cf. figure 1*) *obtained by clostripaïc* (c) *or trypsic* (T) *cleavages.*

EDTA : *ethylendiaminetetra acetic acid.*
$PhMeSO_2F$: *phenylmethylsulfonylfluoride.*
DEAE : *diethylaminoethyl.*

◇ *To whom all correspondence should be addressed.*

It was previously demonstrated in this laboratory that, in each of the four protomers of flavocytochrome b_2, the native chain is folded into three globules linked together by two proteases-sensitive polypeptide bridges [1-4]. The first of these globules (called «n »), located at the N-terminal part of the chain [5] is a cytochrome core which is able to resist to drastic trypsinolysis conditions [6]. The two others (called ε and β') (figure 1) form together the functional flavodehydrogenase domain [3, 4].

In the native enzyme the « a » polypeptide bridge, which connects the two parts (ε and β') of the flavodehydrogenase is the most sensitive to the proteolytic action of several proteases [7-9], including trypsin [1, 10]. Its cleavage does not affect the quaternary structure of the resulting nicked molecule which remains tetrameric [11], but dramatically modifies the molecular activity [10].

Our problem was : a) to determine whether or not such a cleavage affects a unique peptide bond or several ones with subsequent loss of peptide material ; b) if need be, to define the localization and the length of such fragments ; c) to estimate the kinetic parameters of various « αβ type » molecules resulting from proteolytic action of different proteases in zone « a » ; and d) to try to correlate such functional differences to structural modifications in zone « a ».

A preliminary study concerning the proteolytic susceptibility of the « a » zone led us to observe that clostridiopeptidase B (= clostripain) was able to cleave the native chain of *Hansenula anomala* flavocytochrome b_2 into two fragments identified as being α- and β-like. In this paper, we have analyzed the clostripaic limited cleavage of H-flavocytochrome b_2 (*) in order to define the best experimental conditions for the preparation of isolated α and β fragments. A method has been developped that allows their separation without subsequent proteolytic degradation (clostripain elimination). Since clostripain cleaved flavocytochrome b_2 (that we termed $\alpha_c\beta_c$) has kinetic parameters significantly different from those of the native enzyme and of the trypsin cleaved one ($\alpha_T\beta'_T$), we defined their structural differences. The functional and structural properties of hybrid molecules ($\alpha_c\beta'_T$) and ($\alpha_T\beta_c$), which have been simultaneously studied, allowed us to locate on the H-flavocytochrome b_2 chain a peptide the loss of which provokes major functional alterations.

Materials and Methods.

Buffers.

Buffer A : 125 mM NaH_2PO_4/K_2HPO_4 ; 100 mM sodium DL lactate ; 0.25 mM EDTA, pH 7.0 or 8.0.

Buffer B : 100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; 0.4 mM $CaCl_2$, pH 7.4.

Phosphate/urea buffer C : NaH_2PO_4/K_2HPO_4 at various concentrations ; 4 M urea ; 100 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM $PhMeSO_2F$, pH 7.0.

Renaturation buffer D : 150 mM NaH_2PO_4/K_2HPO_4, 100 mM sodium DL lactate ; 100 mM 2-mercaptoethanol 0.25 mM EDTA, 1 mM $PhMeSO_2F$, pH 7.0.

Reagents and resins :

Sephadex G. 25 (Pharmacia) and DEAE cellulose DE 52 (Whatman) were prepared as recommended by the manufacturers. Sephadex G 25 in urea (Merck, quality for Biochemistry)/phosphate buffer C is equilibrated just before use. DEAE cellulose columns in buffer C are prepared no more than two days before use. Phenylmethylsulfonyl fluoride and 2-mercaptoethanol (both from Merck) are extemporaneously added to buffers.

All solutions were made with bidistilled water. Origin of electrophoresis products and most of other products is given in [11].

Trypsin TRTPCK and clostridiopeptidase B (Worthington Biochemical corporation), TLCK (*N*-α-*p*-tosyl L-lysine chloromethyl ketone), L(+) lactate, DL tryptophan and FMN (flavin mononucleotide) were from : Sigma.

Hansenula anomala *flavocytochrome* b_2.

Flavocytochrome b_2 is extracted from *Hansenula anomala* yeast as essentially described in [12] with modifications introduced by Naslin as described in [11]. It is stocked as an ammonium sulfate precipitate (50 per cent saturation) in a 100 mM phosphate, 100 mM sodium DL lactate buffer solution pH 7.0.

The prosthetic heme concentrations were measured on a Perkin Elmer 555 spectrophotometer using as extinction coefficients the values ε_{max} (422 nm) = 183 $mM^{-1}cm^{-1}$ for H-flavocytochrome b_2 and ($\alpha\beta$) forms reduced by sodium thiosulfite and ε_{max} (413 nm) = 121 $mM^{-1}cm^{-1}$ for α oxidized form [13].

For the experiments, a certain amount of suspension was centrifuged (10 min. 18 000 *g*) and the pellet was washed with buffer A pH 8.0 or buffer B, both with ammonium sulfate at 40 per cent saturation. The pellet was then dissolved in buffer A pH 8.0 or buffer B, according to the protease used later.

Flavocytochrome b_2 was equilibrated in the appropriate buffer on a Sephadex G 25 column (∅ 2.5 cm, L =

12 cm ; volume of deposite : 1-2 ml of enzyme solution), and the resulting filtrate was equilibrated 10 min at room temperature before addition of protease.

Preparation of α and β' trypsic fragments (α_T and β'_T).

The trypsinolysis of H-flavocytochrome b_2 and the separation of the resulting α_T and β'_T fragments have already been described [11]. Only modifications of this method are described here :

a) *Proteolysis and separation of the protease :*

Buffer A pH 8.0 was used as proteolytic buffer. After proteolysis, in order to eliminate trypsin from the proteolysate, the solution was poured in a DEAE cellulose column (∅ 2.5 cm, L = 12 cm) equilibrated with buffer A, pH 7.0. After elution of the trypsin, by washing with the same buffer, the flavocytochrome b_2 hydrolysate was eluted with buffer A containing ammonium sulfate (10 per cent saturation) pH 7.0. All fragments (except « n ») were precipitated by addition of an equal volume of buffer A with ammonium sulfate (100 per cent saturation) pH 7.0. The supension was kept one night at 4°C.

b) *Denaturation and separation of* α_T *and* β'_T.

The precipitate was centrifuged 10 min at 18 000 *g* and the resulting pellet was dissolved and incubated for 45 minutes in a minimum amount of phosphate/urea buffer C at 20 mM phosphate concentration. The solution was filtered through a G 25 Sephadex column (∅ 2.5, L = 10 cm) equilibrated in the preceding buffer. The separation of the proteolytic fragments was achieved in a DEAE cellulose column (∅ 2.5, L = 12 cm) equilibrated in the same buffer. β'_T was eluted by washing with this buffer. The eventual residual chains were eliminated by addition of phosphate/urea buffer C with 60 mM phosphate. α_T was finally eluted by the same buffer with ammonium sulfate (10 per cent saturation) pH 7.0.

Preparation of α and β clostripaic fragments (α_c and β_c).

Although this method of preparation has been especially developed for this work, we give it here for a better understanding of the results.

a) *Clostripain activation.*

The protease was generally preactivated, as recommended by the manufacturer, at a concentration of 2-5 mg/ml either overnight at 4°C (method A) or 3-5 hours at room temperature (method B) in the following media : 1 mM $CaCl_2$ 2.5 mM dithiothreitol.

b) *Proteolysis and separation of the protease.*

Proteolysis was made in buffer B at room temperature during 1-2 hours (see « Results » for determination of the accurate duration in each experiment). Final concentrations of H-flavocytochrome b_2 and clostripain were 100-150 μM and 0.6-1.5 μM, respectively. In preparative experiments, when proteolysis had to be stopped, the proteolysate (volume 7-10 ml) was chilled five minutes in ice and poured in a DEAE cellulose column equilibrated with buffer B without $CaCl_2$. H, α_c, β_c and β'_c fragments (see « Results » for the nomenclature) were adsorbed by the resin whereas clostripain was eluted with the initial buffer as demonstrated by a control made with clostripain alone at higher concentration (not shown). The adsorbed species were finally eluted together with the same buffer, plus ammonium sulfate (10 per cent saturation), then precipitated (except « n » if present) with addition of an equal volume of buffer B without $CaCl_2$, 100 per cent saturated by ammonium sulfate, pH 7.0. The suspension was kept over night at 4°C.

c) *Denaturation and separation of* α_c *and* β_c.

The suspension was centrifuged 10 min at 18 000 *g*. The resulting pellet was dissolved and incubated 45 min in the minimum amount of denaturing phosphate/urea buffer C with 20 mM phosphate. This step was followed by a DEAE cellulose chromatography devised to separate β_c, which is eluted with the same buffer, H, which is eluted with buffer C plus 60 mM phosphate, and α_c with the latter buffer plus ammonium sulfate (10 per cent saturation) pH 7.0.

Renaturation of the four « αβ type » species and of H intact chains.

At the end of the second day of the experiment the four α_T, α_c, β'_T, β_c fragments and the H uncleaved chains were available in denaturing phosphate/urea medium.

The two « normal » and the two « hybrid » αβ type molecules were reconstituted with the following precautions : Heme concentrations (*i.e.* α concentrations) were the same in each sample ; β concentrations (calculated by taking into account the value of 2 tryptophanyl residues/β chain), which were the same in each sample were generally in 1.25-fold excess as compared with α concentrations. FMN (~ 50-fold excess), hematin (an equal quantity as bound heme concentrations), $PhMeSO_2F$ (final concentration 1 mM) were also added. The final volume of each sample was the same. The four solutions were dialyzed overnight in the same container against deoxygenated buffer D, then one day in buffer D without 2-mercaptoethanol ; and two days in the latter buffer without $PhMeSO_2F$. After renaturation each sample was centrifuged to eliminate insoluble β in excess (10 min, 40 000*g*) and the supernatant was conserved. For functional studies aliquots (1 ml) were taken and deprived of L(+) lactate in a Sephadex G. 25 column (∅ 1 cm, L = 10 cm). The filtrate was used for K_m, V_{max} and K_L determinations.

Concentration of free and bound flavin and of tryptophanyl residues.

The concentrations of free and bound flavin as well as of tryptophanyl residues were determined fluorometrically, as described in [11] according to [14] and [15] respectively.

Amino terminal sequence manual determination.

Polypeptidic fragments were dialyzed overnight against 0.1 M ammonium acetate buffer pH 7.0 and dried in a dessicator under reduced pressure. Identification of N-ter-

minal amino acid sequence was achieved by the sodium dodecyl sulfate dansyl Edman degradation method of Weiner *et al.* [16]. Chromatography on polyamide plates was performed according to the method of Woods and Wand, as modified by Hartley (see ref. in [16]. Only solvents I, II and III were run. proline/valine and leucine/isoleucine determinations were made only after solvents I and II. For the N-terminal residue of H, α_c and α_T which are suspected to be Asx or Glx, the *o*-tyrosine spot was too large to allow a precise determination by this method.

Automatic sequence determination.

Degradations were carried out with a Beckman sequenator model 890 C in the presence of 2.5 mg polybrene using Beckman program 030176 for 0.1 M quadrol according to [9] with minor modifications (cf legend of table II).

Polyacrylamide/sodium dodecylsulfate gel electrophoresis.

All the electrophoresis procedures including molecular weights determination were the same as in [11]. Minor modifications are eventually noted in the legends of figures.

Results.

Limited clostripaic proteolysis of H-flavocytochrome b_2.

Incubation of H-flavocytochrome b_2 at 20°C in the presence of activated clostripain (concentration : 0.6 μM) results in the cleavage of the polypeptide chain (run 2, figure 2) into a few fragments (run 3-8, figure 2). Their molecular weights are deduced from their electrophoretic migration in acrylamide/sodium dodecyl sulfate gel (cf. Methods and legend of figure 2). In fact, the evolution of the relative proportions of these fragments and their molecular weights indicate that the first proteolytic event is the cleavage of each intact chain H (MW 60 200 ± 2000) into two major fragments (MW 39 000 ± 1 500 and 22 200 ± 2 000, respectively). These fragments are called α_c and β_c by homology with the α and β' type trypsic fragments (figure 1). Three minor species are also formed : X and Y which will not be studied here and a third one (MW 21 300 ± 2 000) ; the electrophoretic mobility of the latter is the same as that of the trypsic fragment called β'_T (cf. figure 2 run 9), hence the name of β'_c. We shall see further that this fragment, by its amino-acid sequence, is actually a β'_T-type fragment.

As seen in run 5-8, figure 2, under such experimental conditions, it is not possible to obtain a quantitative cleavage of the chains into α_c and β_c fragments without further degradation of β_c into β'_c.

During the proteolysis, flavocytochrome b_2 activity is measured by the standard lactate-ferricyanide reductase test [12] at regular time intervals (figure 3). This activity reaches 30 per cent of the initial value when the electrophoretic pattern is that presented figure 2 run 6.

At a preparative scale, in order to obtain a high yield of β_c, with an amount of β'_c less than 10 per cent of the total amount of β type fragments, the proteolysis is stopped (cf. Materials and Methods) as soon as the residual molecular activity reaches 30 per cent of the initial one.

Separation of α_c *and* β_c *fragments produced by the clostripaic proteolysis.*

The α_c and β_c fragments are separated according to the method described in Materials and Methods. Figure 4 shows the electrophoretic pattern at various steps of the separation.

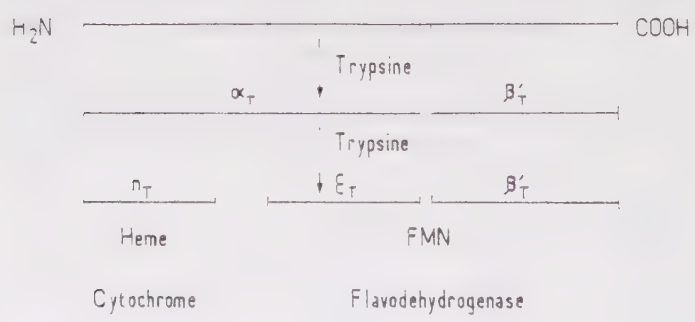

FIG. 1. — *Trypsic degradation scheme of native H-flavocytochrome* b_2 *chain* (cf. ref. 3).

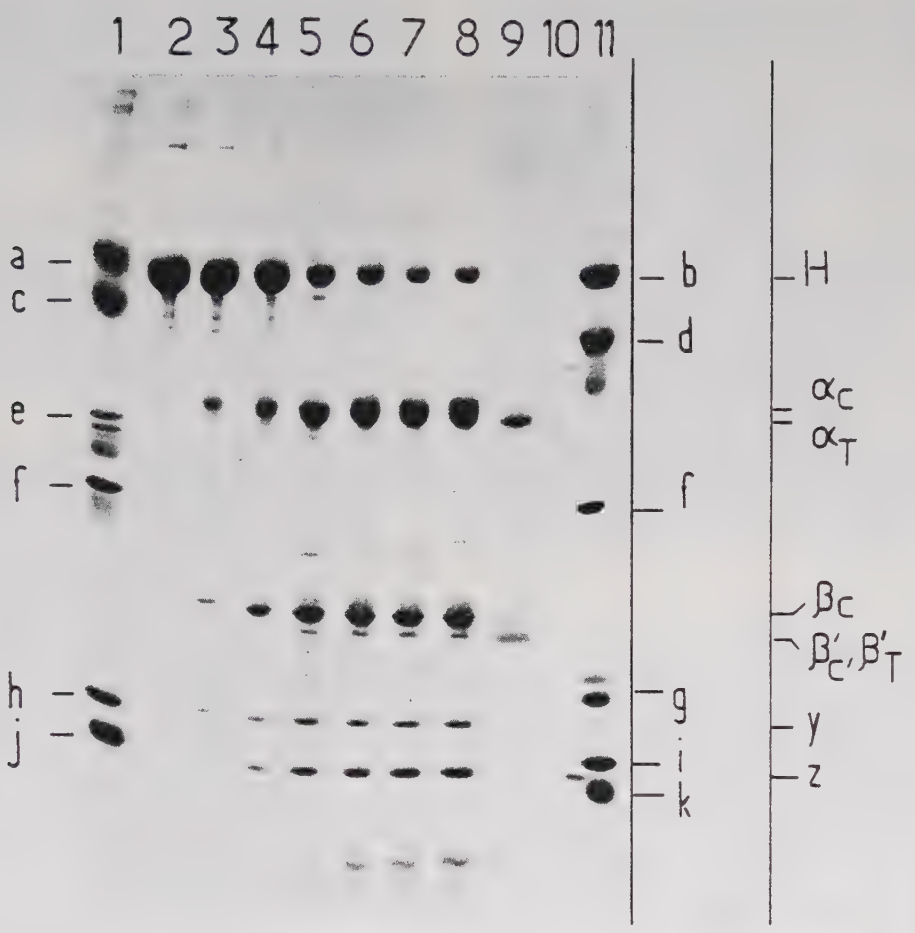

FIG. 2. — *Electrophoretic pattern of H-flavocytochrome* b_2 *submitted to mild proteolysis by clostripain.*

H-flavocytochrome b_2 (105 μM) (run 2 on the gel) was incubated in buffer B at 20°C with clostripain (final concentration 0.6 μM) preactivated as described in Materials and Methods (method B). Aliquots of the proteolysate (20 μl) were taken at the following times : 3, 12, 50, 76, 111, 125 min (runs 3-8).

For each aliquot the proteolysis process was immediately blocked by addition (3 μl) of *N*-α-*p*-tosyl L-lysine chloromethylketone (final concentration 0.9 mM) and freezing in liquid nitrogen. Samples were kept at — 24°C until electrophoresis was done on a vertical plate according to the method of Douglas *et al.* [17] adapted as described in [11] (acrylamide/bis acrylamide gradient 10 per cent - 15 per cent, sodium dodecyl sulfate 0.1 per cent). Run 10 corresponds to clostripain alone at the same concentration as in the other runs. A trypsic proteolysate is presented (run 9) as comparison. Runs 1 and 11 correspond to standard proteins pools used as an inner molecular weights calibration : (a) bovine serum albumine (MW 68 000) (b) catalase (MW 60 000) ; (c) γ globulin I (MW 52 000) ; (d) ovalbumine (MW 43 000) ; (e) lactate dehydrogenase (MW 36 000) ; (f) carbonic anhydrase (MW 29 000) ; (g) soybean trypsin inhibitor (MW 21 500) ; (h) β-lactoglobulin (MW 18 400) ; (i) myoglobin (MW 17 200) ; (j) lysozyme (MW 14 300) ; (g) cytochrome c (MW 12 400).

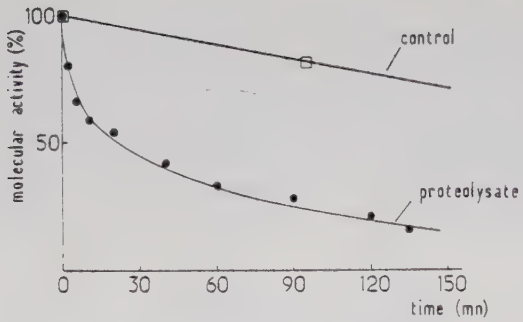

FIG. 3. — *H-flavocytochrome* b_2 *molecular activity decrease during mild proteolysis by clostripain.*

Aliquots of H-flavocytochrome b_2 (1 µl) were taken during the course of proteolysis and immediately tested in the lactate ferricyanide standard activity assay. The experiment is the same as that presented in figure 2.

The activity of H-flavocytochrome b_2 conserved without clostripain under the same conditions of concentration and temperature was tested at time 95 min (control). Controls made in other experiments gave always the same type of results.

Preparation of trypsic fragments.

Trypsinolysis of H-flavocytochrome b_2 and separation of the resulting α_T and β'_T fragments have been already described [11]. The modifications brought to the initial method are indicated in Materials and Methods.

Comparison of trypsic and clostripaic fragments.

According to electrophoresis analysis (figure 5), both α and β clostripaic fragments appear to be larger than their homologous trypsic ones. This result clearly demonstrates that the trypsic cleavage we had previously qualified as « pseudo

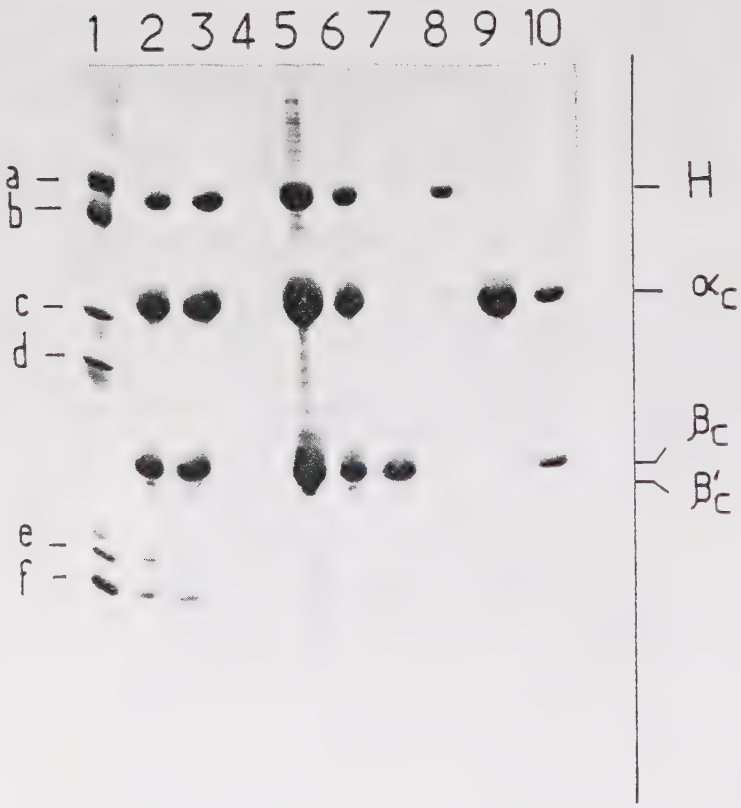

FIG. 4. — *Separation of* α *and* β *fragments after clostripaic proteolysis of H-flavocytochrome* b_2*: electrophoretic pattern.*

H-flavocytochrome b_2 (125 µM) was incubated with clostripain preactivated as described in Materials and Methods (Method B). (Final clostripain concentration 1.5 µM). Proteolysis was stopped when the flavocytochrome b_2 molecular activity reached 400 s^{-1} (initial molecular activity 1260 s^{-1}). Samples (30 µl) were taken at each step of the α_c and β_c preparation for electrophoresis analysis. Clostripain inhibitor (*N* α-*p*-tosyl L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride, final concentration 0.9 mM) was added in the sample taken at the end of clostripaic proteolysis (run 2 on the gel).

Electrophoresis (acrylamide-bis acrylamide 12.5 per cent, sodium dodecyl sulfate 0.1 per cent) is made according to Douglas *et al.* [17] as described in [11]. The following steps of the preparation of α and β clostripaic fragments are presented: fraction eluted (buffer B, without $CaCl_2$, with ammonium sulfate — 10 per cent saturation pH 7.4) from the first DEAE cellulose column (run 3); precipitation of this fraction by ammonium sulfate (final saturation 55 per cent): supernatant of the centrifuged precipitate: (run 4); end of incubation in denaturating media (run 5); elution from Sephadex G 25 in phosphate/urea buffer C (run 6); elution from DEAE cellulose column in denaturating media of: β_c/β'_c (run 7), H-protomeric chain (run 8) α_c (run 9); α_c/β_c reconstitution (run 10). An inner molecular weight calibration (run 1) was made with the following standard proteins: (a) bovine serum albumine MW 68 000 (b) γ globulin I MW 52 000, (c) lactate dehydrogenase MW 36 000, (d) carbonic anhydrase MW 29 000, (e) β-lactoglobulin MW 18 400, and (f) lysozyme MW 14 300.

punctual » [11] is actually achieved with a small loss of peptide material. Such a loss may be roughly estimated from electrophoretic pattern (figure 5) to about MW 900 from β_c fragment and MW 500-1000 from α_c fragment. Location of these polypeptide fragments will be explicited below.

Kinetic parameters of reconstituted αβ species.

α and β fragments isolated after a trypsic and a clostripaic proteolysis are recombined to form the four possible mixings : $\alpha_T\beta'_T$, $\alpha_T\beta_c$, $\alpha_c\beta_c$ and $\alpha_c\beta'_T$ as described in Materials and Methods. Ferricyanide reductase activity of these four species is measured at various L(+)lactate concentrations. The graphic representations of the functions $1/v = f(1/[L(+)\text{lactate}])$ (figure 6 A, B, C, D) and $1/v = f([L(+)\text{lactate}])$ (not shown) are straight lines. The kinetic parameters calculated from these plots are given in table 1. A number of conclusions can be drawn :

a) $\alpha_c\beta_c$ and $\alpha_T\beta'_T$ are characterized by maximum molecular activities (V_{max}) significantly different from each other and equal to 25 per cent and 4 per cent of the uncleaved H-flavocytochrome b_2, respectively.

b) $\alpha_T\beta_c$ and $\alpha_c\beta'_T$ hybrid molecules have maximum molecular activities (V_{max}) significantly different from each other and equal to those of $\alpha_c\beta_c$ and $\alpha_T\beta'_T$, respectively.

These results clearly indicate that the replacement of a β_c fragment by a β'_T fragment provokes a dramatic decrease of maximal activities.

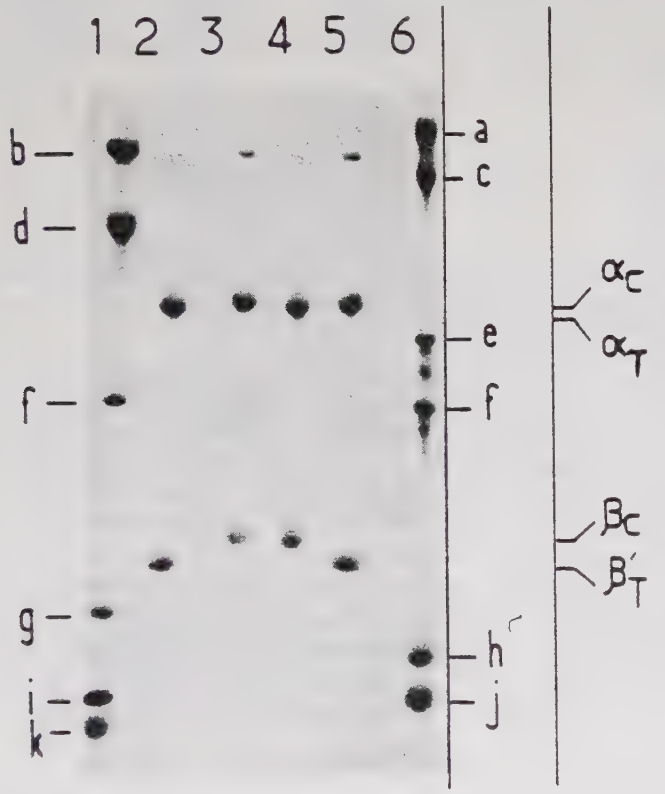

FIG. 5. — *Electrophoretic pattern of the reconstituted αβ species after renaturation.*

After the renaturation step (cf. Materials and Methods) the four αβ solutions are centrifuged 10 min at 39 000 *g* to eliminate insoluble material. Aliquots (25 µl) of the limpid supernatants are taken for electrophoresis (acrylamide-bis acrylamide 12.5 per cent, sodium dodecyl sulfate 0.1 per cent) which was made according to Douglas *et al.* [17] with modifications described in [11].

Runs 2-5 present $\alpha_T\beta'_T$, $\alpha_c\beta_c$, $\alpha_T\beta_c$ and $\alpha_c\beta'_T$ samples respectively. The minor additive band (H) which is present in species containing α_T is due to the presence of protomeric chain in α_T sample, because in this experiment the α_T and β'_T separation was achieved exactly as described in [11], *i.e.* without the supplementary step, now always adopted for elimination of the intact chain H (see the « Results »). Run 1 and 6 correspond to an inner calibration with the same standard proteins as in figure 2.

Identical conclusions concerning the critical role played by the β fragment can be made if two other parameters are considered i) the K_L, which is the apparent dissociation constant of the substrat L(+)lactate acting as excess-inhibitor, ii) the activity measured at a given concentration of cytochrome c (30 µM).

c) the K_m values for L(+)lactate of the four αβ species do not significantly vary in all cases.

They are not different from the K_m value for the non-denaturated, trypsin cleaved ($\alpha_T\beta'_T$) form [10]. However this common value is about twice as high as the value for the uncleaved enzyme, either native [10] or submitted to a denaturation/renaturation treatment identical to that used for the preparation of the four ($\alpha\beta$) species considered above (cf. table I).

The N-terminal sequence of pure β' trypsic fragment was determined by automatic sequencing up to residue 45, with verification by amino acids regeneration from the phenylthiohydantoins except for serines and alanine 40 (table II). The N-terminal sequence of β clostripaic fragment was deduced from automatic sequencing of : a) a pure β_c preparation (8 cycles) without confirmation by regeneration (see table III) ; b) an impure preparation of β_c containing ~ 20 per cent of β'_c (10 cycles) with some amino acids regenerations (cf. table III). The comparison of the sequences determined for β_c and β'_T shows an overlap between them (Ala-Leu-Ser-Ser). The N-terminal sequence of β_c can thus be resolved on 51 residues (figure 7). The identity of the N-terminal sequences of β'_T and β'_c is also demonstrated.

TABLE I.

Characterization of αβ species and uncleaved H-flavocytochrome b_2 after renaturation.

Sample	FMN (μM)	Heme (μM)	Trypt μM	Trypt/Heme	K_m lactate (mM)	V_{max} (1) (s^{-1})	V_{max} (2) (s^{-1})	K_L L (+) lactate (mM)	Molecular activity with 30 μM cytochrome c (s^{-1})
$\alpha_T\beta'_T$	18.3	18.2	62.25	3.4	3.7	36.5	39	785	15
$\alpha_C\beta_C$	14.3	13.6	47.8	3 5	2 6	265	260	170	86
cross renaturated forms :									
$\alpha_T\beta_C$	19.4	18 3	65 4	3 6	2 6	250	230	160	110
$\alpha_C\beta'_T$	16 1	16 2	62 25	3 8	4 4	43	41	910	15
control :									
H	6 5	6 9	52.1	7 5	1.2	930	930	50	450

The four αβ species were prepared as described in « Materials and Methods » and in « Results ». In this particular experiment the proteolysis conditions were the following :

a) trypsinolysis : H-flavocytochrome b_2 : 185 μM ; trypsin : 2.5 μM ;

b) clostripaic proteolysis : H-flavocytochrome b_2 : 215 μM ; clostripain : 1.5 μM. The H-uncleaved chain still present in a clostripaic proteolysate and eluted from a DEAE cellulose column by phosphate urea buffer C with 60 mM phosphate (see text) was used as control. For this sample the renaturation conditions were identical to those used for the four αβ species. After renaturation the five samples were centrifuged to eliminate insoluble material (10 min, 39 000 *g*). Then 1 ml of each solution was poured on a separate G 25 Sephadex column (∅ 1 cm, l = 10 cm) equilibrated in 0.1 M Na/K_2 phosphate buffer pH 7.0 in order to eliminate L(+)lactate and free flavin. Only the most concentrated eluted fraction were pooled for ulterious characterization, which was carried out simultaneously for the five samples.

FMN, heme and tryptophanyl concentrations were determined as described in Materials and Methods. K_m L (+) lactate and V_{max} (1) values were determined from Lineweaver and Burk double reciprocal plots ($1/v = f(1/[L\ (+)\ lactate])$ by linear regression (fig. 6). K_L : for L (+) lactate in excess and V_{max} (2) were determined from plots $1/v = f([L\ (+)\ lactate])$ by linear regression (not presented). The experiment was repeated four times with independently prepared α- and β-type fragments (different proteolysis, separations and renaturations). The conclusions made in the text are valid for each experiment. Nevertheless the V_{max} values for $\alpha_c\beta_c$ and $\alpha_T\beta_c$ may differ from one experiment to another (± 10 per cent). The molecular activity for 30 μM horse heart cytochrome *c* was measured at 30°C in 10 mM L (+) lactate 20 mM Na/K_2 phosphate buffer pH 7.0, according to [18].

Structural modifications resulting from proteolytic processes :

As shown on figure 5 and calculated above, α and β fragments resulting from trypsic and clostripaic proteolysis differ in their lengths by a small member of amino acid residues. In order to locate these residues, sequence investigations were made.

As far as zone « a » is particularly concerned, the detail of the known cleavages occurring in this zone together with the corresponding molecular activities are indicated in figure 8. The trypsic cleavage locus (Tr_2) in zone « a » is distant from the first clostripaic one (Cl_1) by 6 amino acid residues and corresponds to the second clostripaic locus (Cl_2). The sixth residue is an arginine. This is in agreement with specificities of both clostripain (arginine) [19] and trypsin (lysine and arginine) [20]. The loss of six amino acid residues from the N-terminal side of β_c fragment in the $\beta_c \rightarrow \beta'_c$ conversion is in good agreement with the molecular mass difference (900 daltons) estimated by electrophoresis (as seen above).

For the N-terminal side of the chain, α, a dansyl Edman manual degradation was achieved on each of the three H, α_c and α_T chains. For the first amino acid residue of each fragment precise determination was not possible with the method used. However the second and the third residues were identified to be Val-Pro, Val-Pro and Ile-Leu for H, α_c and α_T, respectively. Part of the peptides lost during trypsinolysis are thus localized at the N-terminal of the chain.

TABLE II.

Automatic Edman degradation of H-flavocytochrome b_2 β'_T *fragment.*

Cycle n°	Residue identified	Amount (nmoles)	Confirmation	Cycle n°	Residue identified	Amount (nmoles)	Confirmation
1	Ala	41	+	24	Val/Met	20	Met
2	Leu	57	+	25	Pro		+
3	Ser	20		26	Ile/Phe		Ile
4	Ser	16		27	Val/Met	17	Val
5	Ile Phe	42	Phe	28	Ile	19	+
6	Ile/Phe	34	Ile	29	Lys	16	+
7	Asp	28	+	30	Gly	9	+
8	Pro	32	+	31	Val/Met	20	Val
9	Ser	13		32	Glu	14	+
10	Leu	49	+	33	Arg		+
11	Ser	17	+	34	Lys	10	+
12	Trp	19	+	35	Glu	12	+
13	Lys	29	+	36	Asp	9	+
14	Asp	20	+	37	Val/Met		Val
15	Ile Phe		Ile	38	Leu		+
16	Ala	29	+	39	Leu		+
17	Ile Phe		Phe	40	Ala	11	
18	Ile Phe		Ile	41	Ala	10	
19	Lys	35	+	42	Glu	7	+
20	Ser	4.5		43	Thr/His	5	+
21	Ile Phe		Ile	44	Gly	11	His
22	Thr/His		Thr	45	Ile/Phe		+
23	Lys	35	+				Ile

β' trypsic fragment of H-flavocytochrome b_2 was prepared for automatic degradation as follows : after separation from α_T fragment (cf. Materials and Methods) the β'_T sample was dialyzed two days against a 20 per cent v/v acetic acid solution (dialysis solution changed every 12 hours).

Sample was then dried and stored at — 24°C. Redissolution in 0.5 ml of 20 per cent acetic acid was made before application in the sequenator. For the first residue two condensations with phenylisothiocyanate were performed.

Amino acid phenylthiohydantoins were identified by high pressure liquid chromatography according to [9]. The gradient adopted was 30-85 per cent buffer B in buffer A. (Buffer A was 1 mM sodium acetate in methanol/water 90/10 (v/v) adjusted to pH 4.2 with glacial acetic acid before addition of 0.2 per cent acetone, buffer B was 1 mM sodium acetate in methanol/water 50/50 (v/v)).

All phenylthiohydantoins (except Pth-serine and Pth alanine 40) were back hydrolyzed in the presence of stannous chloride at 150°C. Norleucine was used as control. Amino acid analysis was performed on a Beckman analyzer model 120 C as described in [9]. The experiment was carried out with 50 nanomoles β'_T fragments ; protein concentrations were determined by the fluorometric procedure of Pajot [15] taking into account the value of 2 tryptophanyl residues per chain. Calculated on alanine 1 and alanine 40 the yield was repeatedly equal to 96.5 per cent.

Discussion.

We report in this paper a study of the functional differences observed between different H-flavocytochrome b_2 derivatives obtained by highest molecular activity among other known flavoproteins (1 000 - 1 200 s^{-1} at 30°C) ; b) two molecular species ($\alpha_c\beta_c$ and $\alpha_T\beta_c$) that are moderately active (250 s^{-1}) ; and c) two others $\alpha_c\beta'_T$ and $\alpha_T\beta'_T$) that are poorly active (40 s^{-1}).

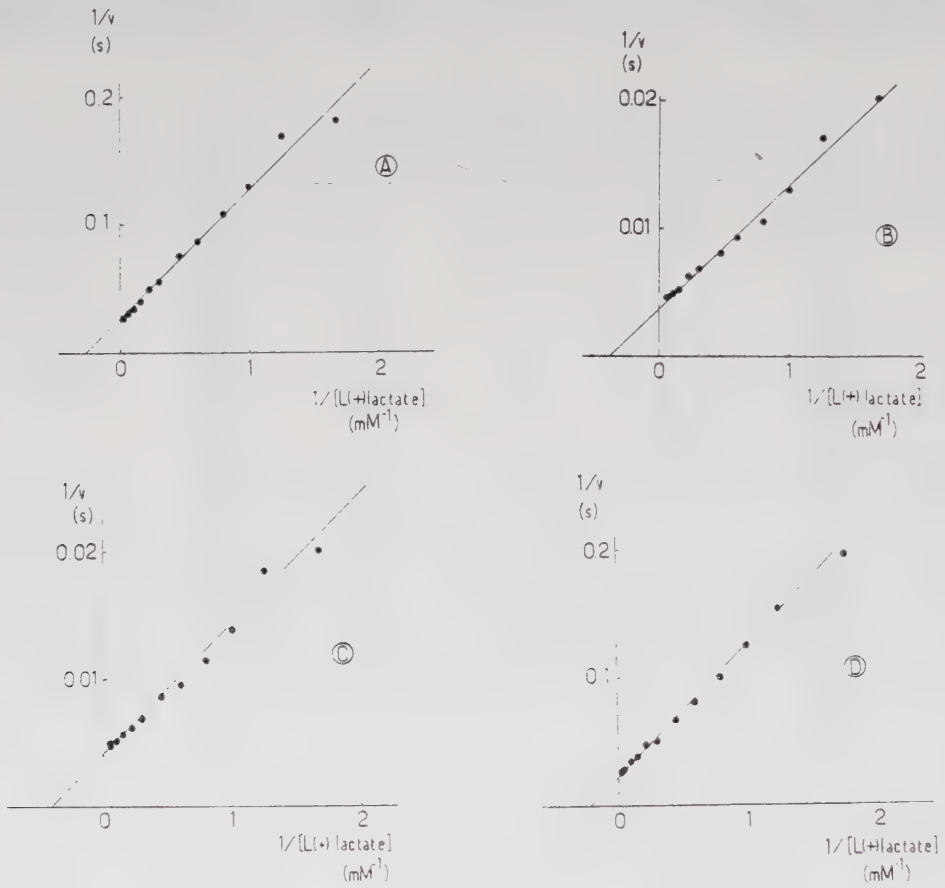

FIG. 6. — *Characterization of αβ renatured species : double reciprocal plots $1/v = f(1/[L(+)\ lactate])$.*

The αβ species are respectively : $\alpha_T\beta'_T$ (A), $\alpha_c\beta_c$ (B), $\alpha_T\beta_c$ (C) and $\alpha_c\beta'_T$ (D) (see legend of table I for experimental conditions).

cleavage at different loci of the same protease-sensitive zone « a ». Among these derivatives two are molecular hybrids ($\alpha_c\beta'_T$ and $\alpha_T\beta_c$) in which one polypeptide fragment resulting from a trypsin digestion is associated with the non homologous polypeptide fragment produced by clostripaic cleavage.

Three groups of functional types can be distinguished : a) the H-flavocytochrome b_2 itself, with its intact chains which exhibits apparently the

The proteolytic processes have induced two distinct effects on the flavocytochrome b_2 activity : the first activity decrease would result from a cleavage ($H \rightarrow \alpha_c\beta_c$) at a single peptide bond (the length of the added α_c and β_c fragments is not significantly different from the length of the native chain). The second activity decrease is due to a loss of peptides.

Two explanations may be proposed for the first activity decrease : i) the native and the cleaved stable conformations are different ; some relaxa-

```
 1                   5                  10                  15
SER-GLN-GLY-ALA-SER-ARG-ALA-LEU-SER-SER-PHE-ILE-ASP-PRO-SER

 16                  20                  25                  30
LEU-SER-TRP-LYS-ASP-ILE-ALA-PHE-ILE-LYS-SER-ILE-THR-LYS-MET

 31                  35                  40                  45
PRO-ILE-VAL-ILE-LYS-GLY-VAL-GLU-ARG-LYS-GLU-ASP-VAL-LEU-LEU

 46                  50
ALA-ALA-GLU-HIS-GLY-ILE....
```

FIG. 7. — *N-terminal sequence of* β_c *H-flavocytochrome* b_2 *fragment The sequence is deduced from results presented in tables II and III.*

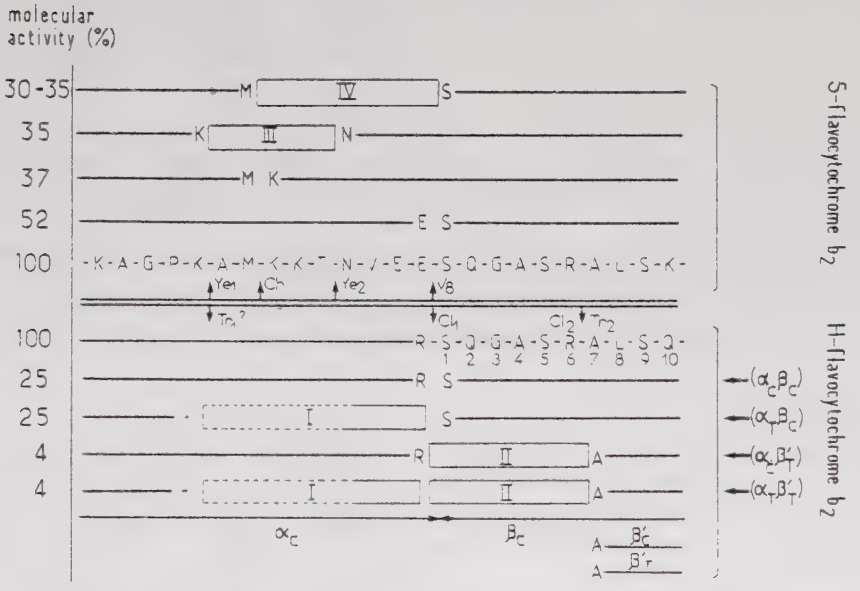

FIG. 8. — *Flavocytochrome* b_2 *proteolytic fragility in* α-β *hinge region.*

Results presented in this paper are tentatively compiled with previous results [9] to draw a general scheme of structure-activity relationships. *H-flavocytochrome* b_2: the amino acid sequence is that presented figure 7. Clostripaic cleavage is supposed to occur without peptidic material loss. The arginine residue which is at the carboxy terminal of α_c is deduced from clostripain specificity. When at least two loci are cleaved the polypeptide segment stretching out between them is supposed to be absent, so the name of « deletion ». If deletion I actually exists, its maximal extension may be evaluated from the comparison of α_T and α_c electrophoretic mobilities in the presence of sodium dodecyl sulfate (see text and figure 5). Nevertheless such molecular weight differences might be only due to the differences detected at N-terminal sides of α_T and α_c. Clostripaic loci (Cl_1 and Cl_2) are indicated in the order of cleavages. For trypsic loci such a numbering (Tr_1 and Tr_2) does not obligatorily imply a sequential order. The actual location of Tr_1 on α_c fragment is not known (see above); its position on the scheme is purely hypothetical. The « a' » and « a » loci of the previous nomenclature [1] correspond to Tr_1 and Cl_2/Tr_2 loci, respectively. The mean value (1000 s^{-1}) measured under standard assay conditions is choosen [as in ref. 4] for 100 per cent activity. The percentage of remaining activity for one αβ renaturated form is expressed as the (V_{max} value/initial standard activity) ratio.

S-flavocytochrome b_2: the amino acid sequence, the cleavage loci and the specific activities of the cleaved forms have been determined by Ghrir and Lederer [9]. Activities were calculated under standard assay conditions. They can be accepted as V_{max} values if one assumes that ferricyanide is still at a saturating concentration for each cleaved form.

(Ye : yeast proteases ; Ch : chymotrypsin ; V_8 : *S. aureus* V_8 protease I).

TABLE III.

Automatic Edman degradation of H-flavocytochrome b_2 β_c *fragment.*

β'_T	Exp 1	β_c	Exp 2	($\beta_c + \beta'_c$)	β_c		β'_c	
(known sequence) cf table I	cycle number	residues identified	cycle number	residues identified	deduced sequence	amount (nmoles)	deduced sequence	amount (nmoles)
Ala	1	Ser	1	Ser + Ala	Ser	4.2	Ala	2.5
Leu	2	Gln	2	Gln + Leu	Gln	13.4	Leu	2.8
Ser	3	Gly	3	Gly + Ser	Gly	13.3	Ser	0.7
Ser	4	Ala	4	Ala* + ?	Ala	11.9	?	—
Phe	5	—	5	Ser + Phe*	Ser	2.7	Phe	5
Ile	6	Arg	6	Glu/Arg + Ile Phe	Glu/Arg	6.8	Ile Phe	2.4
Asp	7	Ala	7	Ala + Asp	Ala	11.5	Asp	3.2
Pro	8	Leu	8	Leu* + Pro*	Leu	10.9	Pro	2.0
Ser			9	Ser	Ser (B'T)	3.3**	Ser	3.3**
Leu			10	Ser + Leu	Ser	2.1	Leu	5.5

Automatic degradation was achieved : a) on pure β_c fragment ; b) on a β_c/β'_c mixture (80/20).

All technical conditions were the same as those described in legend of table II and Materials and Methods except for β_c alone for which no double condensation was achieved. The first degradation was made on 40 nanomoles, the second one on 13.5 nanomoles.

a) for pure β_c, amino terminal serine was determined by dansylation. Other amino acid residues were determined by high pressure liquid chromatography of the phenylthiohydantoins.

b) for the β_c/β'_c mixture residues were identified by high pressure liquid chromatography. The residues confirmed by back hydrolysis of phenylthiohydantoins are indicated by the symbol (*). The 3.3 value (** in the table) corresponds to the sum of the two serine residues which appear at cycle n° 9.

tion of the chain is induced by the rupture of the covalent structure ; ii) or/and the local conformation of the active site is modified by the appearance of $-COO^-$ and $-NH_3^+$ charged groups, as was observed in the activation of chymotrypsinogen into chymotrypsin [21].

From a structural point of view these two possibilities are not necessarily equivalent, for the first hypothesis does not imply a strict proximity of the active site and of zone « a ». The same kind of experiments using flavocytochrome b_2 from *S. cerevisiae* previously showed that single cleavages at different sites of the « a » zone affect differently the standard molecular activity (48 per cent and 63 per cent inactivation by *S. aureus* V8 protease and α chymotrypsin, respectively) [9] (cf. figure 8). Such results show that the locus of the cleavage has itself a critical role in the inactivation of the enzyme and suggest that the first hypothesis in any way is not sufficient to explain the loss of activity in the case of H-flavocytochrome b_2.

Let us now consider the second activity decrease produced by the $\alpha_c\beta_c \rightarrow \alpha_T\beta'_T$ transformation. This decrease is accompanied by the loss of peptides at both α and β N-terminal sides. Moreover other proteolytic cleavages could have also occurred at the C-terminal side of these two fragments. Two remarks concerning this second activity decrease must be made : a) neither the N-terminal cleavage nor the C-terminal one (if present) of the α fragments has any effect on the catalytic properties of the $\alpha\beta$ corresponding species ; b) the C-terminal side of β does not seem to be accessible to proteases in the native folded enzyme, as suggested by the absence of C-terminal proteolysis when *S*-flavocytochrome b_2 is submitted to proteases of less restrictive specificity than trypsine or clostripain [5, 8]. The best interpretation resulting from our experimental data is that this second activity decrease is only correlated with the six amino acid residues loss at the N-terminal of β_c. At least two hypothesis can be proposed to explain the intimate reasons of such a dramatic functional alteration : a) one (or more) of the six residues participate in the correct conformation of the native active site ; b) the positive charge created on the N-terminal alanine residue of β'_T is located at a more critical position towards the active site than the previous one created by the first clostripain cleavage (Cl_1). We cannot solve this problem with our present information.

As far as the reactional mechanism of native H-flavocytochrome b_2 is concerned, it was shown by Blandin *et al.* [22] that the two first steps of the electron transfer (lactate → flavin and flavin → heme) were together limiting in the overall catalytic reaction. A rapid-kinetic study is now in progress in order to determine which step is actually modified. Our results can be compared with the results obtained by Strittmatter *et al.* [23] for another flavoprotein : NADH cytochrome b_5 reductase. In this enzyme two domains which are trypsin resistant (T_1 and T_2) are linked together by a trypsin sensitive polypeptide bridge. In this particular case, the connecting bridge plays also a functional role. Its cleavage provokes a V_{max} decrease by a factor of 0.3 while the K_m for NADH and for cytochrome b_5 increases by factors of 6 and 4.5, respectively.

The amino acid sequence determined for β_c (figure 7) was studied in terms of prediction of secondary structure, according to the method of Chou and Fasman [24]. The first evidence is the presence of an α helix nucleation center from valine 43 to glutamic acid 48 (the numbering begins at the first residue of β_c, cf. figure 7). Such an helix may extend itself from residue 37 to residue 49. Another segment (Lys 25-Met 30) is predicted as being helical. Two segments (Ile 21 - Ile 24) and (Ile 32 - Ile 34) are predicted as β sheet nucleation centers. The proximity of both α and β structure near residue 25 does not allow to predict with equal accuracy the secondary structure in this zone. Nevertheless the succession of α and β structure, if confirmed, would be compatible with a nucleotide binding domain (Rossmann fold) [25, 26]. The presence of such a fold is conceivable in flavocytochrome b_2 since flavin is a mononucleotide. It is present in other flavoproteins : the flavodoxins [27, 28] and was already proposed for *S*-flavocytochrome b_2 to explain its behaviour towards Cibacron blue [29]. The fact that the β globule might constitute part of this nucleotide binding domain would be an additional argument to suggest that this globule plays an essential — but insufficient — role in the creation of the flavin binding site, as we previously proposed [11, 30].

When the two H- and *S*-flavocytochrome b_2 are compared, a number of differences between them have to be noticed [cf. 31 for a recent review]. However, as far as amino acid sequences are concerned, large homologies are detected for the known parts of their β fragments. Such an homology (9 residues conserved among 11 residues) is not *a priori* amazing for *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala* are not distant in the classification of yeasts. However the N-terminal part of the α fragment (which is the N-terminal of the whole chain) is not the same. Neither the Pro-Val nor the Ile-Leu sequence is detected at the N-terminus of S-flavocytochrome b_2 [5, 32]. Such a difference may be ascribed to divergent evolution or to the fact that the N-terminal part of H-flavocytochrome b_2 is more extended, by a few residues, than *S*-flavocytochrome b_2. It was recently shown [33] that S-flavocytochrome b_2 was synthetized as a preenzyme which is processed in mitochondria. It would be possible that the maturation step does not imply the same proteolytic locus in both enzymes. Further sequence studies should solve this problem.

Acknowledgements.

We wish to thank Dr. F. Labeyrie, in whose laboratory this work has been performed, for fruitful advices and stimulating discussions. We are indebted to Dr. F. Lederer who welcomed us for the sequences and N-terminal determinations. The precious contribution of Mrs. A. Glatigny, A. M. Becam and Mr. R. Ghrir was greatly appreciated on that occasion. We also thank Mrs L. Naslin and Mrs. G. Peudevin for the preparation of H-flavocytochrome b_2 and Mrs. D. Lapointe for the realization of the manuscript.

REFERENCES.

1. Naslin, L., Spyridakis, A. & Labeyrie, F. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 34, 268-283.
2. Gervais, M. (1976) Thèse de Doctorat de 3e Cycle, Biologie Cellulaire, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.
3. Gervais, M., Groudinsky, O., Risler, Y. & Labeyrie, F. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 77, 1543-1551.
4. Gervais, M. & Tegoni, M. (1980) *Eur. J. Biochem.*, 111, 357-367.
5. Guiard, B., Lederer, F. & Jacq, C. (1975) *Nature*, 255, 422-423.
6. Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y. & Naslin, L. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 128, 492-503.
7. Jacq, C. & Lederer, F. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 25, 41-48.
8. Pompon, D. & Lederer, F. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 68, 415-423.
9. Ghrir, R. & Lederer, F. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 120, 279-287.

10. Gervais, M., Risler, Y., Capeillère-Blandin, C., Vergnes, O. & Labeyrie, F. (1979) *in « Limited Proteolysis in Microorganisms »*, Cohen, G. N. & Holzer, H. eds. DHEW publication n° (NIH) 79-1591, Washington DC. US Government Printing Office, p. 227-234.
11. Gervais, M., Labeyrie, F., Risler, Y. & Vergnes, O. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **111**, 17-31.
12. Labeyrie, F., Baudras, A. & Lederer, F. (1978) *Methods Enzymol.*, **53**, 238-256.
13. Pajot, P. & Groudinsky, O. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 158-164.
14. Iwatsubo, M. & di Franco, A. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 891-910.
15. Pajot, P. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **63**, 263-269.
16. Weiner, A. M., Platt, T. & Weber, K. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3242-3251.
17. Douglas, M. G., Finkelstein, D. B. & Butow, R. A. (1979) *Methods Enzymol.*, **56**, 58-66.
18. Baudras, A. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 1143-1175.
19. Gilles, A. M., Imhoff, J. M. & Keil, B. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 1462-1468.
20. Keil, B. (1971) *The Enzymes*, Boyer, P. D. ed. Vol. III, 3rd Edition pp. 249-275. Academic Press, New York & London.
21. Stroud, R. M., Krieger, M., Koeppe II, R. E., Kossiakoff, A. A. & Chambers, J. L. (1975) *in « Proteases and Biological Control »* Reich, E., Rifkin, D. B. & Shaw, E. eds, Cold Spring Harbor Laboratories pp. 13-22.
22. Capeillère-Blandin, C., Barber, M. J. & Bray, R. C. (1982) *in « Flavins and Flavoproteins »* (Massey, V. & Williams, C. H. Jr, eds) Elsevier North Holland, New York, pp. 838-843.
23. Strittmatter, P., Barry, R. E. & Corcoran, D. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 2768-2775.
24. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978) *Adv. Enzymol.*, **47**, 45-108.
25. Rao, S. T. & Rossmann, M. G. (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 241-256.
26. Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974) *Nature*, **250**, 194-199.
27. Watenpaugh, K. D., Sieker, L. C., Jensen, L. H., Legall, J. & Dubourdieu, M. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3185-3188.
28. Burnett, R. M., Darling, G. D., Kendall, D. S., LeQuesne, M. E., Mayhew, S. G., Smith, W. W. & Ludwig, M. L. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4383-4392.
29. Pompon, D. & Lederer, F. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **90**, 563-569.
30. Mével-Ninio, M., Risler, Y. & Labeyrie, F. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **73**, 131-140.
31. Labeyrie, F. (1982) *in « Flavins and Flavoproteins »*, (Massey, V. & Williams, C. H. O. eds) Elsevier North Holland, New York, pp. 823-832.
32. Guiard, B. & Lederer, F. (1976) *Biochimie*, **58**, 305-316.
33. Gasser, S. M., Ohashi, A., Daum, G., Böhni, P. C., Gibson, J., Ried, G. A., Yonetani, T. & Schatz, G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 267-271.

5857V

FEBS - Journal
Boulevard de la Constitution, 69
B - 4020 LIÈGE (Belgique)

- 2 AOUT 1982

PROTEOLYTIC CLEAVAGE OF HANSENULA ANOMALA FLAVOCYTOCHROME b_2 INTO ITS TWO FUNCTIONAL DOMAINS : ISOLATION OF A HIGHLY ACTIVE FLAVODEHYDROGENASE AND A CYTOCHROME b_2 CORE.

Michel GERVAIS, Yanick RISLER and Sylvie CORAZZIN

Laboratoire d'Enzymologie Physicochimique
Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique. Laboratoire associé à l'Université Pierre et Marie Curie
91 190 Gif-sur-Yvette, France.

Running title : Flavocytochrome b_2 : isolation of the active flavodehydrogenase domain.

to whom all correspondence should be addressed :

ire du C.N.R.S.

You will help us by :

1. supplying at least two copies of the revised manuscript
2. indicating in the manuscript as to where illustrations and graphs should appear.

and Structure

Letter from the Editorial Office of the European Journal of Biochemistry under separate cover.

Full postal address :

Michel GERVAIS, Yanick RISLER and Sylvie CORAZZIN

Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S.

91 190 GIF-sur-YVETTE, France

Abbreviations : DEAE cellulose : diethylaminoethyl cellulose

$PhMeSO_2F$: phenylmethylsulfonyl fluoride

FMN : flavin mononucleotide

Enzymes : flavocytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxydoreductase, EC 1.1.2.3). S- and H-flavocytochrome b_2 are extracted from Saccharomyces cerevisiae and Hansenula anomala yeasts, respectively. FDH : flavodehydrogenase domain of flavocytochrome b_2.

SUMMARY

In a previous work, we have described the trypsic cleavage of yeast flavocytochrome $\underline{b}_2$ into its two functional domains : a cytochrome $\underline{b}_2$ core and a flavodehydrogenase. The lactate dehydrogenase efficiency of the latter was however dramatically low, only about 1 % that of intact flavocytochrome $\underline{b}_2$. Our present study concerns a new flavodehydrogenase derivative of Hansenula anomala flavocytochrome $\underline{b}_2$ which spontaneously dissociates from the cytochrome domain when their connecting polypeptide bridge is cleaved by S.aureus V8 protease I.

This flavodehydrogenase was purified and some of its functional and structural properties were studied. It presents an exceptionally high lactate dehydrogenase activity, about 80 % that of flavocytochrome $\underline{b}_2$. This result clearly demonstrates that the cytochrome domain is not necessary to the lactate dehydrogenase function and suggests an autonomous folding for both domains.

Our results are discussed in terms of "gene fusion".

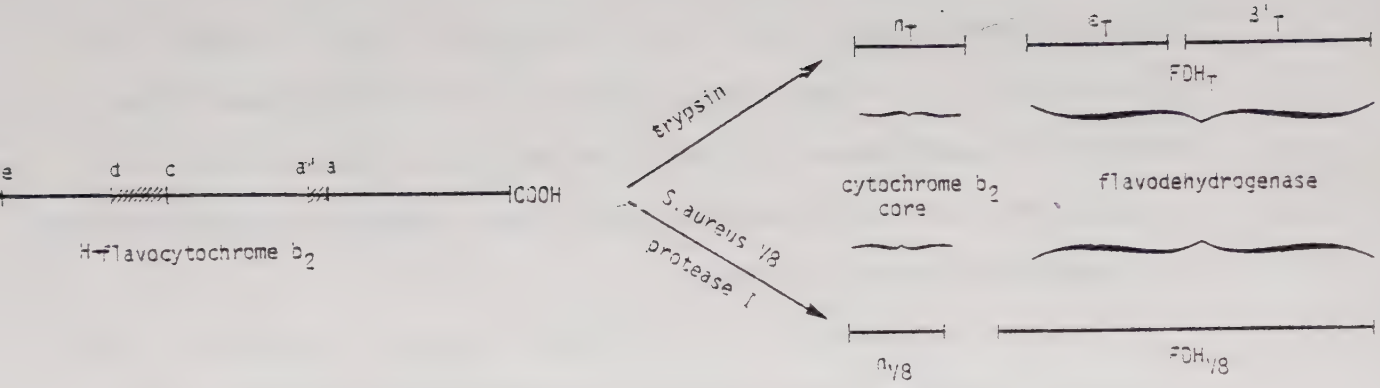

Figure 1

Figure 1 : Mild proteolysis of native H.anomala flavocytochrome b_2 by tryosin and S.aureus V8 protease I

The tryosic proteolytic scheme was determined by Gervais et al. (3). The nomenclature of the proteases-sensitive zones 'aa' and cd was introduced by Maslin et al. (1). A third sensitive zone, limited by locus 'e' was added to previous representations in order to take into account the recent sequence data concerning the trypsic cleavage of the N-terminal side of the chain (14). The actual length of this zone is not yet known. The molecular weights of the tryosin-resistant fragments (globules a, c, and 3') are given in (1).

For the S.aureus V8 protease I degradation scheme, the nomenclature and the molecular weights of the two fragments are given in the text. Due to the apparent unaccessibility to proteases of the C-terminal side of the flavocytochrome b_2 chain, the C-terminal ends of 3' and FDH_{V8} fragments have been aligned. It is not known if the N-terminal ends of the native chain and of the a_{V8} fragment are the same. The quaternary structure of the proteolytic fragments is precised in the text.

INTRODUCTION

Each chain of yeast flavocytochrome $\underline{b}_2$ has been shown to be folded into three globules : n, ε and β' joined together in the "intact" enzyme by two protease-sensitive bridges "aa'" and "cd" (1-4) (cf. figure 1).

Two of these globules (ε and β') form together a flavodehydrogenase domain (2,3). The third one (n), located at the N-terminal part of the chain (5) is a "b_5-like" cytochrome (6) which is,in the flavocytochrome, the specific electron acceptor of the flavodehydrogenase (7,8).

These two functional domains -flavodehydrogenase and cytochrome- which spontaneously dissociate from each other when their "cd" connecting bridge is cleaved by trypsin were isolated as stable, pure, molecular entities, termed FDH_T and n_T respectively (2,3,9).

Unfortunately, this "cd" polypeptide bridge is not, along the whole native chain, the most sensitive towards trypsin : the "aa'" zone is cleaved about 20 times faster (10), so that FDH_T was always found altered by this undesirable inner cleavage, which was achieved with a loss of about 20 amino acids residues (3).

From a functional point of view, the first cleavage in "aa'" results in a 96 % loss of activity (11) ; the isolated "nicked" FDH_T entity itself only retains about 1 % of the ferricyanide reductase activity of native flavocytochrome $\underline{b}_2$ (10). These results did not allow to know whether such a low activity was due to the "aa'" cleavage itself or to the cytochrome $\underline{b}_2$ core release resulting from the second "cd" cleavage.

In the present study are given pieces of information concerning this question. In spite of the hypersensitivity of the "aa'" zone towards a numbe of proteases (12-14) we succeeded in obtaining a cleavage in the "cd" zone faster than in the "aa'" zone.This was achieved with Hansenula anomala flavo cytochrome $\underline{b}_2$ and the highly specific S.aureus V8 protease I. We describ a method allowing to separate the so-formed "intact" flavodehydrogenase

part -that we currently term "FDH V_8"- from the other proteolysis products Steady state catalytic parameters of this new flavocytochrome b_2 derivative have been determined and compared with those of the native flavocytochrome b_2 and its trypsic derivatives.

MATERIALS AND METHODS

Hansenula anomala flavocytochrome b_2 : was prepared according to (15) with minor modifications described in (11). Itwas stored as an ammonium sulfate precipitate (50 % saturation). Before each experiment the required amount (∿ 40 mg) was taken out and centrifuged (10 mn, 20000 g). The pellet was suspended in buffer A (75 mM ammonium acetate, 100 mM sodium DL lactate, 40 % saturation ammonium sulfate, pH 7.8) and centrifuged (10 mn, 20 000 g) This operation was repeated twice. After the second centrifugation, the pellet was dissolved in a minimum amount of buffer B (buffer A without ammonium sulfate) and the solution was filtrated through a G-25 Sephadex column (Ø 2 cm, h = 10 cm) equilibrated in the same buffer.

H-flavocytochrome b_2 concentrations were determined with a Perkin Elmer 555 spectrophotometer using the extinction coefficient $\varepsilon_{423nm} = 183\ mM^{-1}cm^{-1}$ for the dithionite reduced form (16).

Proteolysis : The proteolysis was achieved by incubating the flavocytochrome b_2 filtrate (∿ 100 µM) during 140-220 mn with S.aureus V_8 protease I (Miles laboratories) (final concentration : 0.1 - 0.2 mg/ml). Aliquotes were taken during the course of proteolysis for *a*) activity measurements with the standard lactate-ferricyanide reductase test as described in (15) *b*) SDS electrophoresis analysis which was achieved according to (17) with minor modifications described in (11) *c*) determination of the amount of cytochrome b_2 core released from native flavocytochrome b_2 after cleavage of the "cd" zone (see definitions in the

text) according to the method described in the next paragraph.

Determination of the amount of cytochrome b_2 core : 75 µl of the proteolysate were taken each 30 minutes, mixed with an equal volume of buffer C (0.1 M NaH_2PO_4/K_2HPO_4, 0.1 M sodium DL lactate, 100 % saturated with ammonium sulfate, pH 7.5) and immediately centrifuged (5 mn, 3500 g) in order to separate the precipitated uncleaved flavocytochrome b_2 and "intact flavodehydrogenase from the cytochrome b_2 core remaining in solution. The concentration of the latter was spectrophotometrically determined using the extinction coefficient $\varepsilon_{423nm} = 173\ mM^{-1}cm^{-1}$ for the dithionite reduced form (18).

Molecular sieving of the bulk proteolysate : At the end of proteolysis, the proteolysate was chilled for five minutes at 4°C ; then ammonium sulfate was added (final saturation 70 %). After centrifugation (10 mn, 25 000 g) the pellet was dissolved in a minimum amount of buffer D (same as buffer B but at pH 7.0). A molecular sieving of this solution was achieved in a Sephadex G.100 column (Ø 1.5 cm, h = 40 cm) preequilibrated and eluted with buffer D (flow rate = 0.6 ml/mn). Only the first red fractions were kept for the next step which consisted of an ammonium sulfate precipitation (final saturation 70 %). The resulting suspension was conserved overnight at 4°C in the presence of phenymethyl sulfonyl fluoride (final concentration : 1 mM)

Denaturation step : After centrifugation (10 mn, 20 000 g), the pellet was dissolved in denaturating buffer E (10 mM NaH_2PO_4/K_2HPO_4, 4 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.25 mM ethylen diaminetetra acetic acid, 1 mM $PhMeSO_2F$, pH 7.0) and the solution was equilibrated in this buffer through a G.25 Sephadex column (Ø 2.5 cm, h = 10 cm). The filtrate was poured onto a DEAE-cellulose column (Ø 2.5 cm, h = 12 cm) equilibrated with buffer E. The elution was achieved with buffer E, then by increase of the ionic

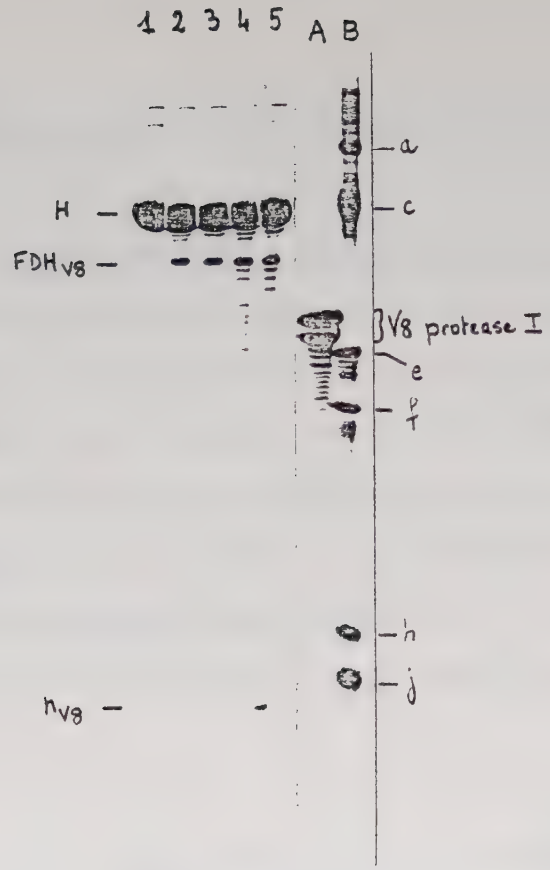

Figure 2 : Proteolytic cleavage of H.anomala flavocytochrome b_2 by S.aureus V8 protease I : electrophoretic analysis

Flavocytochrome b_2 (170 µM) (run 1) is incubated with S.aureus V8 protease I (final concentration 0.1 mg/ml) in ammonium acetate buffer B at 20°C. Aliquotes (15 µl) are taken at time : 30 mn, 62 mn, 100 mn and 135 mn (run 2 to 5) and analysed in SDS electrophoresis (12.5 % acrylamide / bis acrylamide ; 0.1 % sodium dodecyl sulfate) as described in (17). A control was made (run A) with S.aureus V8 proteaseI alone but 200 times more concentrated. An internal molecular weight calibration is achieved (run B) with the following standard proteins (a): bovine serum albumin (68 000) ; (c): γ globulin I (52 000) ; (e): lactate dehydrogenase (36 000); (f): carbonic anhydrase (29 000) ; (h): β lactoglobulin (18 400) ; and (j): lysozyme (14 300).

strength with buffer F (idem E but 35 mM phosphate), G (idem E but 60 mM phosphate) and H (buffer G plus ammonium sulfate, 10 % saturation).

Renaturation step : The renaturation of isolated FDH_{V8} and H fragments was achieved as described for α and β' trypsic fragments (11).

Determination of tryptophan and flavin concentrations : Tryptophanyl residues and flavin concentrations were determined fluorometrically as respectively described in (19) and (20). For the tryptophanyl residues the 1.1 corrective factor introduced by Pajot (19) has been applied.

Reagents and resins : G.25 Sephadex (Pharmacia) and DEAE cellulose DE52 (Whatman) were prepared as described in (14).
All solutions were made with bidistilled water. Origin of electrophoresis products and most of other products was given in (11).

RESULTS

As shown in figure 2, the action of S.aureus V8 protease I on Hansenula anomala flavocytochrome b_2 gives rise to a major product termed FDH V_8, whose molecular weight with the standard inner calibration was estimated to ca 43 000. Minor components are also formed, in particular a scarcely detectable species called n_{V8} (MW ca 11 000) which will be further identified as a cytochrome core. These two fragments result from the following proteolytic event : H chain → FDH.V_8 + n V_8 + peptides ($\Sigma \sim$ 6 600 daltons) (figure 1) as it was suspected from their concomitant appearance and their pseudo complementary molecular weights

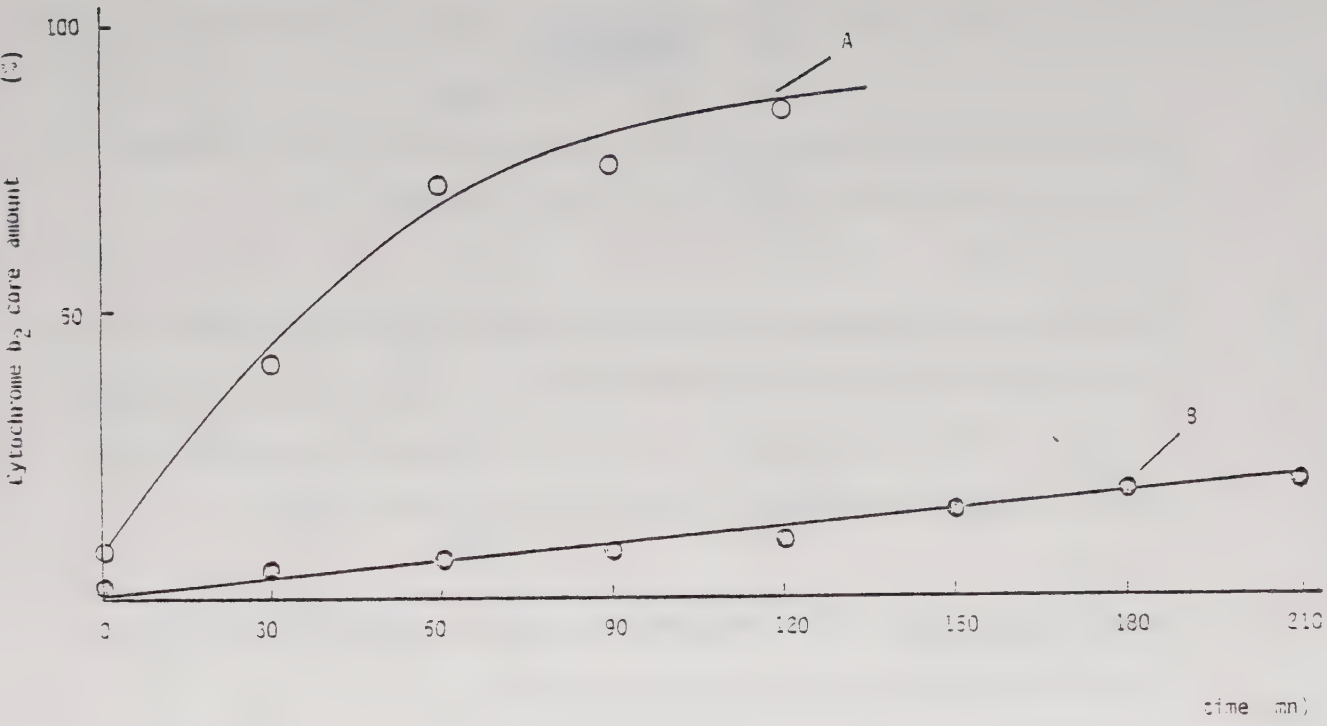

Figure 3

Figure 3 : Cytochrome b_2 core release during mild proteolysis of H.anomala flavocytochrome b_2 by S.aureus V8 protease I.

The incubation of S.aureus V8 protease I with native flavocytochrome b_2 results in the cleavage of its chain into two functional domains : a flavodehydrogenase and a cytochrome core (see text). The advancement of such a proteolysis is detected by measuring the amount of cytochrome b_2 core in the proteolysate at various times according to the method described in Material and Methods. This amount is expressed as the ratio : cytochrome b_2 core concentration/initial flavocytochrome b_2 concentration. Two experiments corresponding to different concentrations of S.aureus V8 protease are presented. The proteolysis conditions were respectively : experiment A : flavocytochrome b_2 = 120 µM, S.aureus protease = 0.6 mg/ml ; experiment B: flavocytochrome b_2 = 100 µM, S.aureus protease = 0.1 mg/ml ; both proteolysis are achieved in ammonium acetate buffer 8, 20°C.

While the nV_8 fragment resists to ulterior proteolysis, the $FDHV_8$ fragment does not much accumulate (not shown), so it is not possible to obtain the fragmentation of all chains without further degradation of $FDHV_8$ fragment. In groovy preparations, choice was made to stop the proteolysis process at a state similar to that presented in figure 2, (run 3 or run 4). As no detectable change of H-flavocytochrome b_2 molecular activity can be related to such a cleavage, the degree of proteolysis was estimated by measuring the yield of the cytochrome b_2 core (n V_8) released from the native enzyme after cleavage of the polypeptide bridge connecting the flavodehydrogenase and the cytochrome b_2 core domains as described in Materials and Methods and shown in figure 3. Up to now the best results were obtained by stopping the proteolysis when [cytochrome b_2 core] / [initial flavocytochrome b_2] ratio is 0.2 - 0.3.

Separation of the components of the proteolysate

This separation is achieved by a two-step procedure : the first one is a molecular sieving in neutral buffer, the second one a chromatography in a 4 M urea, phosphate buffer.

A/ *First step : molecular sieving in neutral buffer :*

Figure 4 shows the partition of bound heme and bound flavin in the fractions eluted from a G.100 Sephadex column. Two red fractions (peaks I and II) are well separated. Peak I corresponds to species nearly excluded from the gel (K_{av} = 0.04) and contains both bound heme and bound flavin ; the flavin/heme ratio (1.3/1) is significantly different from the 1/1 value found for the native flavocytochrome b_2. The analysis of some fractions of peak I by SDS electrophoresis (figure 5) reveals in all of them the presence of two species that can be identified as "intact" chain and $FDHV_8$ fragment.

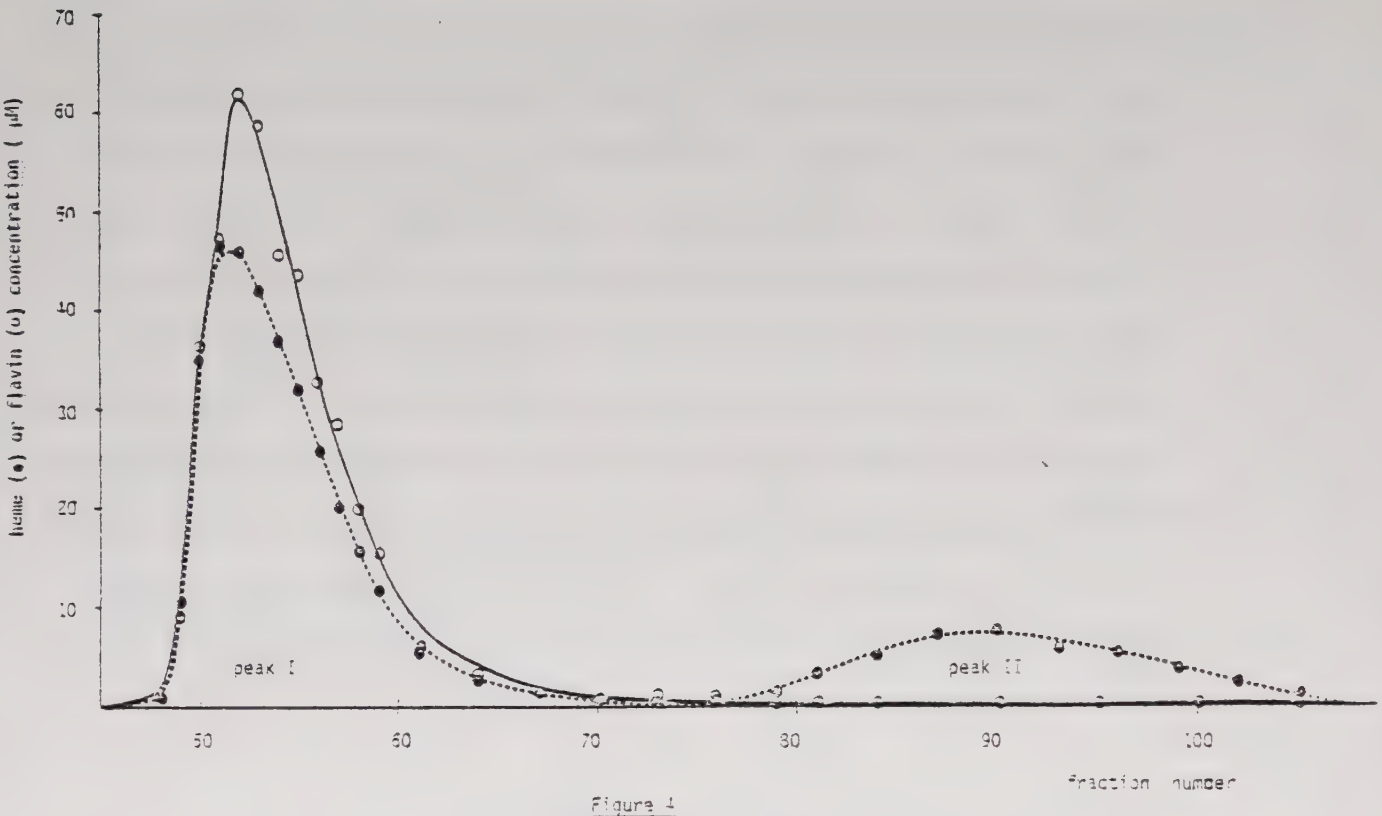

Figure 4

Figure 4 : Molecular sieving of H-flavocytochrome b_2 proteolysate

The bulk proteolysate resulting from a mild proteolysis of native flavocytochrome b_2 by S.aureus V8 protease I (experiment B of figure 3, incubation time : 220 mn) is precipitated by ammonium sulfate and centrifuged as described in materialsand methods. The pellet is dissolved in buffer D and the solution is poured on a 3.100 Sephadex column equilibrated with the same buffer (Ø 2.6 cm, L = 40 cm). The elution is achieved with a flow rate of 0.3 ml/mn. Prosthetic heme (•) and prosthetic flavin (o) concentrations are measured as described in materials and methods.

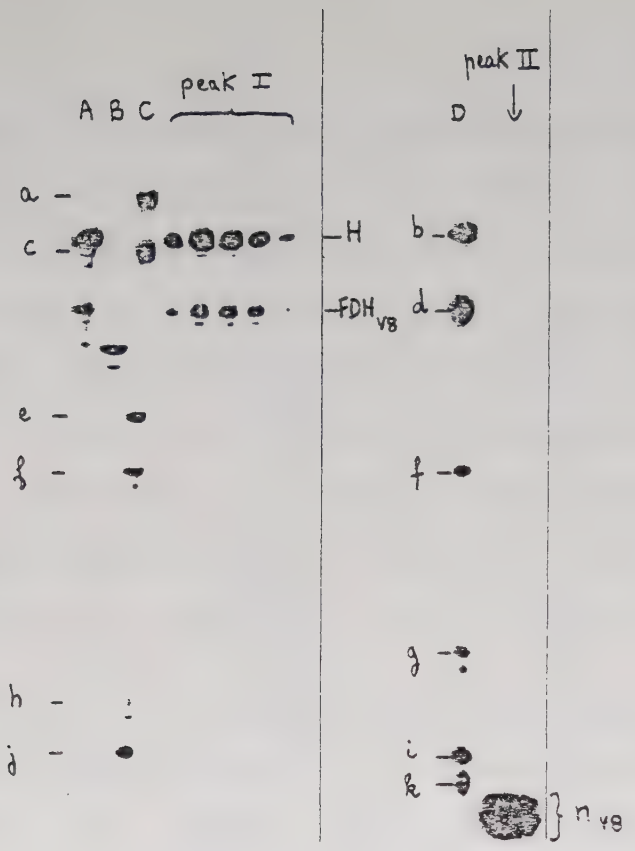

Figure 5 : Molecular sieving of the H-flavocytochrome b_2 proteolysate : electrophoretic analysis

The constituants of the two peaks (I and II) separated by molecular sieving (cf. figure 4) are analysed by SDS electrophoresis (12.5 % acrylamide-bis acrylamide ; 0.1 % SDS) as described in (17). Fractions of peak II are concentrated before electrophoresis by an ammonium sulfate precipitation (final saturation 85 %). Run A shows the composition of the proteolysate before the molecular sieving. Run B corresponds to S.aureus V8 protease I alone (11 times more concentrated than in the proteolysate). An inner molecular weight calibration (runs C and D) is achieved with the following standard proteins : (a): bovine serum albumin (68 000) ; (b): catalase (60 000) ; (c): γ globulin I (52 000), (d) ovalbumin (43 000); (e): lactate dehydrogenase (36 000) ; (f): carbonic anhydrase (29 000) ; (g): soybean trypsic inhibitor (21 500), (h): β lactoglobulin (18 400) ; (i): myoglobin (17 200), (j): lysozyme (14 300) ; (k): cytochrome c (12 400).

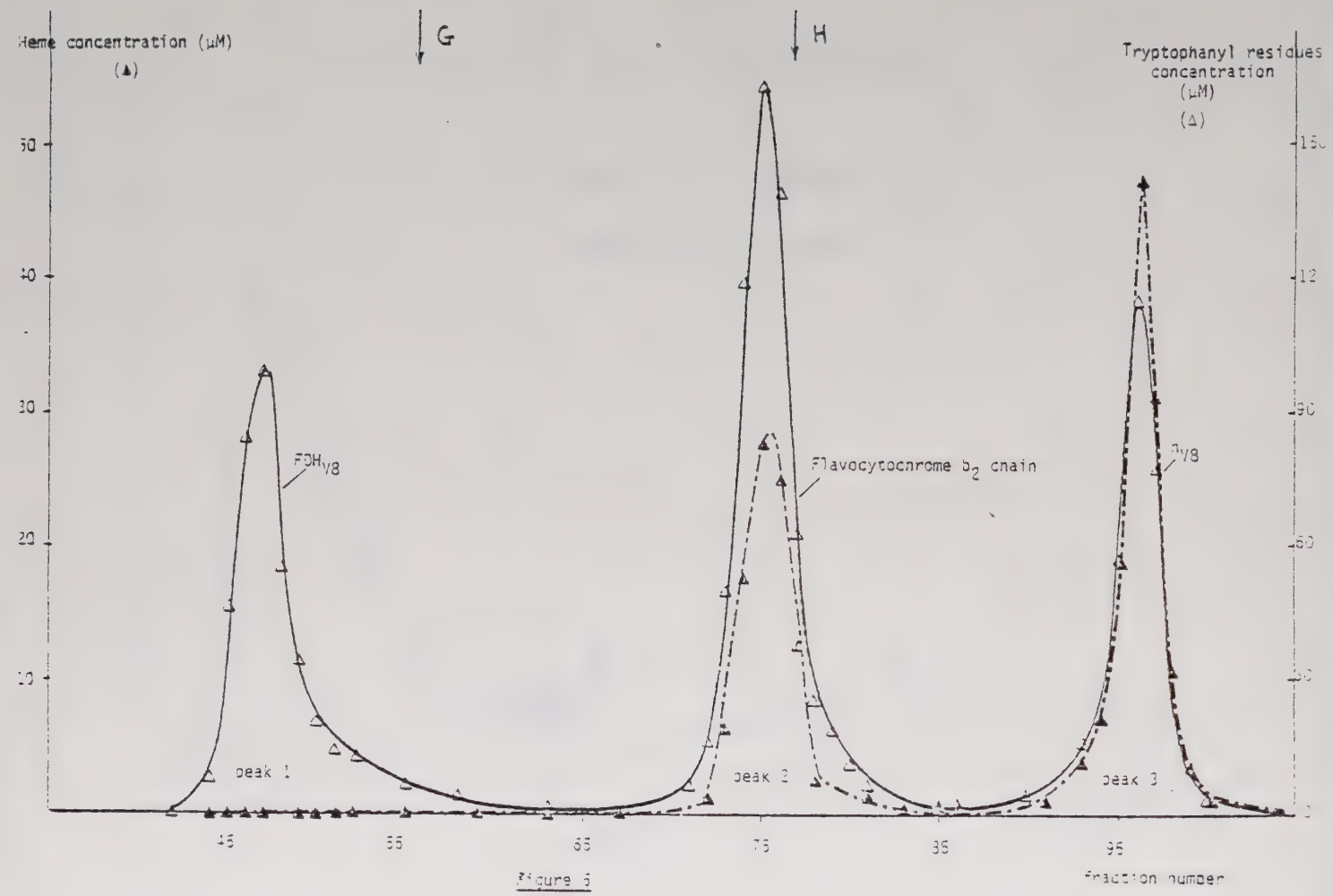

Figure 6

Figure 6 : Separation of the FDH fragment in denaturing medium

The most concentrated fractions corresponding to peak I figure 4 (fractions 49 — 60) were pooled and precipitated by ammonium sulfate (final saturation 70%). PheMeSO$_2$F (final concentration 1 mM) was added. The suspension was kept overnight at 4°C, then centrifuged 10 mn, 20 000 g. The resulting pellet was dissolved and the solution was equilibrated in phosphate/urea denaturing buffer (cf. Materials and Methods). In these conditions, due probably to some protease molecules which had not been separated from peak I by the G.100 molecular sieving, some further proteolysis happened. In particular, cytochrome b_2 core was released from flavocytochrome b_2 chains which had not yet been cleaved. The separation of the FDH$_{V8}$ chain from all fragments bearing heme was achieved in a DEAE cellulose column (Ø 2 cm, L = 12 cm, flow rate : 0.6 ml/mn) as described in Materials and Methods. Both heme (▲) and tryptophanyl residues (Δ) contents were measured in the eluted fractions. The arrows on the figure indicate times of buffer change.

Peak II corresponds to a cytochrome $\underline{b}_2$ core species n_{V_8} with K_{av} = 0.61. This value is similar to the K_{av} = 0.64 which is found for horse heart cytochrome c on the same column and suggests a similar molecular weight for both proteins. The SDS electrophoretic analysis of peak II (figure 5) reveals the presence of one fragment (or two fragments of close molecular weights) (MW 11 000) which can be assimilated to the low molecular weight species (n_{V_8}) detected during proteolysis (cf. figure 2). This cytochrome core has a molecular weight significantly lower than those obtained by trypsinolysis (MW 14 600 and 13 800) (4).

B/ *Second step : DEAE cellulose chromatography in 4M urea :*

The components of peak I (a mixture of "intact" flavocytochrome b_2 and "intact" $FDHv_8$ fragment) are resolved on a DEAE cellulose column in a 4 M urea medium as described in material and methods. Under such conditions heme remains bound but flavin is released (14). Three fractions (peaks 1,2,3 are separated during the elution by the progressive increase of the ionic strength (figure 5). Only fractions 2 and 3 (and not 1) are cytochromic. The SDS-electrophoretic analysis of these fractions (figure 6) shows that fraction 1 contains the $FDHv_8$ fragment as a major constituent, nevertheless some degradation products are also present. Fraction 2 contains mainly the "intact" chain H. Fraction 3 corresponds mainly to the cytochromic fragment n_{V_8} which results from parasite degradation of "intact" chains H taking place after the G 100 Sephadex column.

Renaturation of the $FDHv_8$ fragment :

After separation from the other components of the proteolysate, the $FDHv_8$ fragment (fraction 1 figure 5) is renatured in the presence of flavin mononucleotide as described in (11). Some structural and functional properties of the reconstituted flavoprotein are given below.

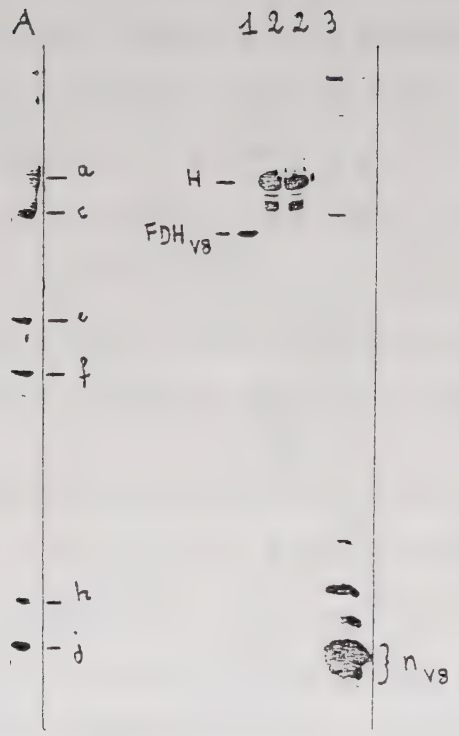

Figure 7 : Electrophoretic analysis of the constituants separated by DEAE cellulose chromatography

The constituants separated with buffers F, G and H (peak 1, 2 and 3, fig. 6) were analysed by electrophoresis (run 1-3 respectively) as described in (V) (12.5 % acrylamide/bis acrylamide, 0.1 % sodium dodecyl sulfate). In some experiments peak 1 presents a more heterogenous pattern than those presented in this figure. Nevertheless heme is yet quite undetectable and the FDH_{V8} is always the major constituant.

An internal molecular weight calibration (run A) was made with the following standard proteins :(a): bovine serum albumin (68 000) ; (c): γ globulin II (52 000) ; (e): lactate dehydrogenase (36 000) ; (f): carbonic anhydrase (29 000) ; (h): Blactoglobulin (18 400) ; (j): lysozyme (14 300).

Quaternary structure of the renatured $FDHv_8$ molecules :

A preliminary determination of the molecular weight of the $FDHv_8$ molecule on a G 200 Sephadex column (Ø = 0.9 cm, h = 54.5 cm) gave a K_{av} = 0.24 corresponding, according to the plots K_{av} = f(Log MW) given by the manufacturer to a molecular weight of about 200 000. Taking into accoun the value found for the monomeric $FDHv_8$ chain (MW 43 000), the $FDHv_8$ molecule appears to be under a tetrameric state like the flavocytochrome $\underline{b}_2$ itself.

Functional properties of the $FDHv_8$ fragment :

Table 1 gives the steady state kinetic parameters recovered in two distinct typical experiments by the FDH_{V8} molecule after renaturation. A comparison is made with those of flavocytochrome $\underline{b}_2$ itself and its two trypsic derivatives : FDH_T and $(\alpha\beta')_T$.

If compared to flavocytochrome $\underline{b}_2$, the FDH_{V8} molecule is characterized by a 25 fold increase of the Km ferricyanide. At ferricyanide saturation and at the same L-(+)lactate concentration (10 mM) the intact FDH_{V8} presents an exceptionally high lactate dehydrogenase activity : about 80 % that of the "intact" flavocytochrome $\underline{b}_2$ submitted to the same denaturation renaturation treatment, ie about 50 times more than the nicked FDH_T. K_m L(+)lacta values for FDH_{V8} and flavocytochrome $\underline{b}_2$ are slightly different (3.5 and 1.2 mM respectively), but we cannot assert that it is significant. Excess lactate inhibition, which occurs in flavocytochrome $\underline{b}_2$ is still present in FDH_{V8} but at higher concentrations. The K_L L(+)lactate, which is the apparent dissociation constant of L(+)lactate acting as excess inhibitor is increased by a factor 2.5. This inhibition was no more present in both $(\alpha\beta')_T$ and FDH_T derivatives. In the lactate-cytochrome c reductase test, the intact FDH_{V8} does not present any significative activity, as FDH_T, and contrastingly to the $(\alpha\beta')_T$ derivative.

Table I : Steady state kinetic parameters of the "intact" flavodehydrogenase derivative of H.anomala flavocytochrome b_2 ($FDH_{\gamma\beta}$) : a comparison with intact flavocytochrome b_2 and its two trypsic derivatives

1/ Species obtained after a denaturation-renaturation treatment :

a) $FDH_{\gamma\beta}$ derivative was prepared as described in "Materials and Methods" and "Results" sections. At the end of the renaturation step, the $FDH_{\gamma\beta}$ sample was centrifuged (10 mn, 39 000 g) in order to eliminate possible traces of insoluble material. 1 ml of the resulting clear supernatant was deprived of sodium L(+)lactate by filtration through a G.25 Sephadex column (Ø 1 cm, h = 10 cm) equilibrated in 0.1 M NaH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer pH 7.0. Only the most concentrated eluted fractions (chain concentration > 8 µM) were taken for the determination of the kinetic parameters. K_m ferricyanide values were determined by linear regression from Lineweaver Burk double reciprocal plots 1/v = f(1/(ferricyanide)) for a 10 mM L(+)lactate concentration. V_{max} and K_m L(+)lactate were determined by linear regression from Lineweaver-Burk double reciprocal plots 1/v = f(1/(L(+)lactate)) at saturation of ferricyanide (25 and 20 mM for experiments A and B respectively). The K_i L(+)lactate, which is the apparent dissociation constant of the substrate L(+)lactate acting as excess inhibitor, was determined by linear regression from the plot 1/v = f(L(+)lactate) at saturation of ferricyanide. Most of the experimental conditions (pH, buffer, temperature) of the activity tests were the same as in the standard test (15). Due to the high absorbance of the ferricyanide solution, absorbance decreases were measured at 460 nm with $\Delta\varepsilon_{ferricyanide-ferrocyanide}$: 0.07 $mM^{-1}cm^{-1}$ (F. Labeyrie, personnal communication). The molecular activities are calculated per bound flavin.

The two $FDH_{\gamma\beta}$ samples tested in experiments A and B were independently prepared and characterized as follows :

exp. A : (bound FMN) = 16.8 µM, (tryptophanyl residues)/(FMN) = 3.3

exp. B : (bound FMN) = 8.7 µM, (tryptophanyl residues)/(FMN) = 4.4

In both samples heme was undetectable (< 0.03 µM). It should be noticed that the theoretical (tryptophanyl residues)/(FMN) ratio is 3 for the $FDH_{\gamma\beta}$ fragment (2 tryptophans in β'(14) and 1 tryptophan in α (11)). The experimental ratios agree with nearly one rebound FMN per $FDH_{\gamma\beta}$ chain.

b) $(\alpha\beta)_4$: this form corresponds to the whole flavocytochrome b_2, cleaved in "aa'" zone by trypsin (11). Its kinetic parameters are those given in (11).

c) H-flavocytochrome b_2 : the kinetic parameters are those given in (14)

2/ Native species

The kinetic parameters of native flavocytochrome b_2, $(\alpha\beta)_4$ and FDH_4 were given in (10) except for the K_m ferricyanide of FDH_4 and $(\alpha\beta)_4$ (21) and for flavocytochrome b_2 cytochrome c activity which was independently measured. The (*) value given for native flavocytochrome b_2 was measured for a 10 mM L(+)lactate concentration. It is slightly different from the actual V_{max} value extrapolated from a Lineweaver-Burk plot 1/v = f(1/L(+)lactate) (cf. 21).

Species obtained following upon a denaturation (4M urea) - renaturation process.

		K_m L(+)lactate (mM)	K_m ferricyanide (mM)	V_{max} (s^{-1})	K_L L(+)lactate (mM)	Cyt.c activity (s^{-1})
"intact" flavodehydrogenase (FDH_{V_8})	A	3.5	2-3	690	130	0.4
	B	-	2.4	735	-	$\leqslant$ 0.1
"nicked" flavocytochrome b_2 $(\alpha\beta')_T$		3.7	-	36-39	785	15
flavocytochrome b_2		1.2	-	930	50	450

Species obtained without denaturation

"nicked" flavodehydrogenase (FDH_T)	50	0.4	14	> 2000	0
"nicked" flavocytochrome b_2 $(\alpha\beta')_T$	2.5	0.1	40	510	-
flavocytochrome b_2	1	0.1	950*	45	500

Table 1

DISCUSSION

Proteolytic cleavage of H.anomala flavocytochrome b_2 by S.aureus protease I

The cytochrome domain of flavocytochrome b_2 (cytochrome b_2 core) was isolated and characterized in a pioneer work by Labeyrie and coworkers more than 15 years ago (6). Another flavocytochrome b_2 fragment, termed P_1 (MW ca 50 000), which was ascribed to correspond to the flavodehydrogenase domain was ulteriously detected as a contaminant of some flavocytochrome b_2 preparations (1). Assays to control its formation or to isolate it were however unsuccessful (Baudras and Labeyrie, unpublished results). The cytochrome and flavodehydrogenase domains of flavocytochrome b_2 were finally isolated after mild trypsinolysis of H.anomala flavocytochrome b_2, however the resulting flavodehydrogenase molecule was a "nicked" form (3). When S.aureus V8 protease I is used as a proteolytic agent (this study) the partition of the two functional domains can also be obtained : a cytochrome core (nV_8) is formed along with a flavodehydrogenase ($FDHV_8$). They have no affinity for each other and are eluted separately by molecular sieving. An additive step which consists in a chromatography in urea 4 M is necessary to separate the $FDHV_8$ from residual intact chains. If the loci where cleavages of the chain take place are compared, a primordial difference between trypsin and S.aureus V_8 protease I action has to be emphasized. The former led to the formation of a two-chain (α and β') flavodehydrogenase (2,3) with a molecular weight of $\simeq$ 38 000 (16 700 + 21 300) per protomer (4) whereas the latter leads to a one-chain flavodehydrogenase ($FDHV_8$) with a molecular weight of 43 000 per protomer.

This result is completely in agreement with the three globule tertiary structure model that we have previously proposed for native flavocytochrome b_2, these three globules being linked together by two protease sensitive bridges (3).

One may wonder why the "aa'" bridge of H-flavocytochrome $\underline{b_2}$ is not cleaved by S.aureus V_8 protease I in spite of its hypersensitivity towards all other tested proteases (12, 14 and unpublished results). The most probable explanation could be the absence in this zone of aspartic or glutamic acid residues, which are specifically cleaved by S.aureus V_8 protease I (22, 23). One argument support this hypothesis : the strategic glutamic acid which constitutes in homologous S-flavocytochrome $\underline{b_2}$ "aa'" zone, the unique site of cleavage by S.aureus V8 protease I (13) is replaced in H-flavocytochrome b_2 by an arginine (14). Neither aspartic nor glutamic acid residue had been indeed detected in the one third of the "aa'" zone the sequence of which has been recently elucidated (14).

If now is considered the interdomain "cd" zone, it is not very surprising according to its length ($\underline{ca}$ 65 residues (3)) to notice that it contains at least one residue corresponding to the S.aureus V_8 protease specificity.

Renaturation of the FDH_{V_8} molecule

The renaturation of the FDH V_8 molecule in the presence of FMN was achieved by the procedure previously used for H-flavocytochrome b_2 which allowed both a quantitative re-binding of FMN and a 100 per cent activity recovery (11, 14). It should be recalled that the C-terminal part of the FDH_{V_8} molecule (the β' globule) was not able alone to become solubilised in such conditions. This points out the important role of the N-terminal part of the FDH_{V_8} molecule (the ε globule) in its solubility .

Structural and functional properties of the FDH_{V8} molecule :

The quaternary structure recovered after renaturation by FDH_{V8} fragment is tetrameric. A similar quaternary structure was previously found for native flavocytochrome $\underline{b}_2$ (24) or FDH_T (3).

As far as the functional properties of the FDH_{V8} molecule are concerned and compared to those of native H-flavocytochrome b_2, the first point to be underlined is the increase of the K_m ferricyanide value. Such an increase was already observed for the dehemo S-flavocytochrome $\underline{b}_2$ (8) and FDH_T (21). As shown by Iwatsubo et al (8), it was not related to a modification of the K_d ferricyanide value but to that of the K value of the flavin reoxidation step. In fact, in the case of dehemoderivatives, the electrons are directly delivered by FMN to the external acceptor -ferricyanide- while, in the whole enzyme, the prosthetic heme is the acceptor from flavin and the donor to ferricyanide.

The most relevant point of this functional study is the high lactate ferricyanide reductase molecular activity recovered by FDH_{V8}, which reaches in some experiments 80 per cent that of flavocytochrome $\underline{b}_2$ submitted to the same denaturation-renaturation process. The difference is probably due to an irreversible denaturation of part of the FDH_{V8} molecules. Such a good efficiency demonstrates clearly that the release of the cytochrome core doesn't alter at all the dehydrogenase function ie the electron transfer from lactate to the prosthetic flavin.

If now the low activity of the nicked FDH_T is reminded, we can conclude a posteriori that it is mainly due to the "aa'" cleavage itself. The role of the "aa'" polypeptide segment in the control of the overall activity has been recently analysed in details (14).

The inhibition by excess of lactate was found to be characteristic of the "intact" forms of both S- and H-flavocytochrome $\underline{b}_2$ (24-26). Its mechanism has not been elucidated up to now. As shown recently (14) in the case of H-flavocytochrome $\underline{b}_2$, the inhibition is no more observed when

6 amino acids residues of the "aa'" zone are cut off. Contrary to what was found with FDH_T, an important inhibition by excess of lactate is observed for FDH_{V8}. This suggests that cytochrome $\underline{b_2}$ core is not involved in this inhibition.

Another important data is the incapacity, for the FDH_{V8} molecule to catalyse the oxydation of L(+)lactate in the presence of cytochrome c as external acceptor. Such an incapacity was already demonstrated for dehemo S-flavocytochrome b_2 (24, 27) and for FDH_T (10). Our results confirm, the compulsory presence of bound heme for cytochrome $\underline{c}$ reduction ; in other words in the whole enzyme cytochrome $\underline{b_2}$ core is the specific donor to cytochrome $\underline{c}$.

As shown recently however the FDH_{V8} molecule is able to bind Zn-cytochrome c, as well as the whole flavocytochrome $\underline{b_2}$ (same K_d = 0.1 µM, in 10 mM phosphate buffer, and same stoechiometry)(28). All these results point at the following paradox : in flavocytochrome $\underline{b_2}$ the domain which binds cytochrome $\underline{c}$ -the flavodehydrogenase domain- is unable to transfer electrons to it, while its specific donor the cytochrome $\underline{b_2}$ core has low affinity for it. This paradox will be discussed in more details elsewhere (Thomas, M.A. et all, unpublished).

Flavocytochrome $\underline{b_2}$ as a protein issuing from a gene fusion

The spontaneous separation of the two functional domains of flavocytochrome $\underline{b_2}$ -a flavodehydrogenase and a cytochrome- after cleavage of their connecting bridge and the refolding of the FDH_{V8} molecule with recovery of activity suggest an autonomous folding of these two functional domains. These results are in agreement with the gene fusion hypothesis previously proposed (29), the protease sensitive "cd" zone being the trace of this fusion at the level of the polypeptide chain (21). In sulfite oxidase, a "b_5 like" cytochrome which was shown to be homologous by its amino acids sequence (30) to cytochrome $\underline{b_2}$ core (31) is covalently linked to its molybdenoreductase (32). A gene fusion hypothesis was also proposed for this enzyme (32).

In the light of our present data, it appears that the similarities between flavocytochrome $\underline{b}_2$ and sulfite oxidase may be extended to the integration mode of the cytochrome domain in the two complexes enzymes. In both cases (this work and (32)), a mild proteolysis provokes the spontaneous dissociation of the two functional domains suggesting a low affinity for each other. Moreover both isolated cytochrome reductase part: of the two molecules (FDH_{V8} in flavocytochrome $\underline{b}_2$, the molybdenum moiety in sulfite oxidase), which largely retain the ferricyanide reducing activity of the native enzyme, have lost their ability to reduce cytochrome c. Such particularities may explain the selective advantage of a gene fusion for both enzymes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. F. Labeyrie, in whose laboratory this work has been performed for fruitful advices and stimulating discussions. We are indebted to Mrs L. Naslin and Mrs. G. Peudevin for the preparation of H-flavocytochrome b_2 and to Mrs. D. Lapointe for the realization of the manuscript.

REFERENCES

1. Naslin, L., Spyridakis, A. & Labeyrie, F. (1973) *Eur. J. Biochem. 34,* 268-283.

2. Gervais, M., Groudinsky, O. & Labeyrie F. (1975) *10th FEBS Meeting,* Paris, Abstr. n° 1247.

3. Gervais, M., Groudinsky, O., Risler, Y. & Labeyrie, F. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm. 77,* 1543-1551.

4. Gervais, M. & Tegoni, M. (1980) *Eur. J. Biochem. 111,* 357-367.

5. Guiard, B., Lederer, F. & Jacq, C. (1975) *Nature, 25,* 422-423.

6. Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y. & Naslin, L. (1966) *Biochim. Biophys. Acta, 128,* 492-503.

7. Capeillère-Blandin, C., Bray, R.C., Iwatsubo, M. & Labeyrie, F. (1975) *Eur. J. Biochem. 54.* 549-566.

8. Iwatsubo, M., Mêvel-Ninio, M. & Labeyrie, F. (1977) *Biochemistry, 16,* 3558-3566.

9. Prats, M. (1977) *Eur. J. Biochem. 75,* 619-625.

10. Gervais, M., Risler, Y., Capeillère-Blandin, C., Vergnes, O. & Labeyrie, F., (1979) in *"Limited Proteolysis in Microorganisms"*, Cohen, G.N. & Holzer,H eds. Dept. Heath, Education and Welfare Pub. NIH 79 1591 U.S. Government printing office, Washington, pp. 227-234.

11. Gervais, M., Labeyrie, F., Risler, Y. & Vergnes, O. (1980) *Eur. J. Biochem. 111,* 17-31.

12. Pompon, D. & Lederer, F. (1976) *Eur. J. Biochem. 68,* 415-423.

13. Ghrir, R. & Lederer, F. (1981) *Eur. J. Biochem. 120,* 279-287.

14. Gervais, M., Corazzin, S. & Risler, Y. (1982) *Biochimie,* in press.

15. Labeyrie, F., Baudras, A. & Lederer, F. (1978) in *Methods in Enzymology,* Vol. 53, 238-256.

16. Pajot, P. & Groudinsky, O. (1970) *Eur. J. Biochem. 12,* 158-164.

17. Douglas, M.G., Finkelstein, D.B. & Butow, R.A.(1979) in *Methods in Enzymol. 56,* 58-66.

18. Groudinsky, O. (1972) *Thèse de Doctorat d'Etat, Paris*

19. Pajot, P. (1976) *Eur. J. Biochem. 63,* 263-269.

20. Iwatsubo, M. & di Franco, A. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol. 47,* 891-910.

21. Gervais, M. (1976) *Thèse de 3ème cycle,* Biologie Cellulaire, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.

22. Drapeau, G.R., Boily, Y. & Houmard, J. (1972) *J. Biol. Chem. 247,* 6720-6726.

23. Houmard, J. & Drapeau, G.R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69,* 3506-3509.

24. Baudras, A. & Spyridakis, A. (1971) *Biochimie, 53,* 943-955.

25. Somlo, M. & Slonimski, P.P. (1966) *Bull. Soc. Chim. Biol. 48,* 1221-1249.

26. Jacq, C. & Lederer, F. (1972) *Eur. J. Biochem. 25,* 41-48.

27. Forestier, J.P. & Baudras, A. (1971) in *Flavins and Flavoproteins* Kamin, H.,ed., University Park Press, pp. 599-605.

28. Gervais, M., Thomas, M.A., Labeyrie, F., Favaudon, V. & Pochon, F. (1982) in *Flavins and Flavoproteins,* Massey, V. & Williams, C.H. Jr. eds, Elsevier North Holland, New York, pp. 833-837.

29. Labeyrie, F. & Baudras, A. (1972) *Eur. J. Biochem. 25,* 33-40.

30. Guiard, B. & Lederer, F. (1979) *Eur. J. Biochem. 100,* 441-453.

31. Guiard, B., Groudinsky, O. & Lederer, F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71,* 2539-2543.

32. Johnson, J.L. & Rajagopalan, K.V. (1977) *J. Biol. Chem. 252,* 2017-2025.

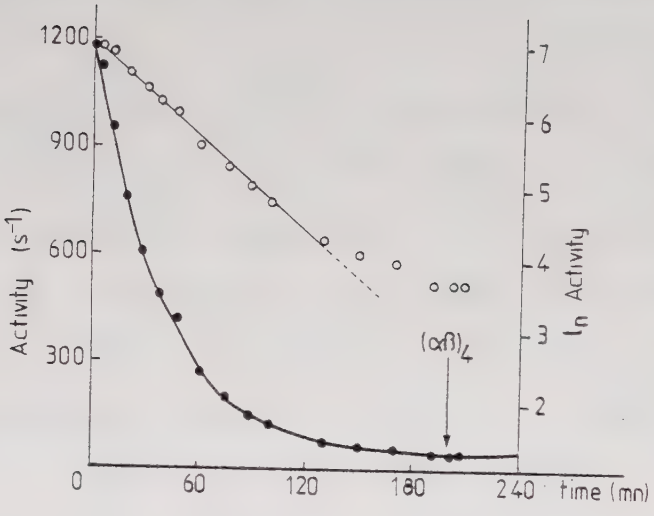

Figure 8 : Perte de l'activité lactate → ferricyanure reductasique du H-flavocytochrome b_2 durant le clivage de la zone "a" par la trypsine selon Gervais et al. (239)

• : représentation directe, o : représentation du 1er ordre

DISCUSSION CHAPITRE III

Dans les deux chapitres précédents ainsi que dans le chapitre suivant, nous nous sommes attachés à déterminer quelles structures tertiaires étaient nécessaires à la fixation des coenzymes, des substrats ou à l'expression des fonctions sans tenir compte du degré éventuel d'altération de ces dernières.

Dans ce chapitre sont au contraire présentées des données quantitatives relatives aux perturbations fonctionnelles consécutives à des modifications structurales résultant de protéolyses limitées.

Dans une première partie nous ferons en quelque sorte un bilan des altérations fonctionnelles observées. Dans une seconde partie nous essaierons de comprendre les processus réactionnels qui ont été modifiés.

I - MODIFICATIONS FONCTIONNELLES CONSECUTIVES AUX COUPURES PROTEOLYTIQUES :

1 - Coupure protéolytique de la zone intrafonctionnelle "a" :

A - Coupure trypsique du H-flavocytochrome b_2

Ainsi que nous l'avons antérieurement montré, le premier évènement protéolytique détecté (grâce aux techniques d'électrophorèse en SDS) lors de la trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2 est la coupure de la chaîne H dans la zone "a" avec formation des deux fragments α_T et β'_T (voir article III, figure 2). Un tel clivage s'accompagne d'une dramatique perte d'activité mesurée dans les conditions standard d'essai définies dans (232) (voir figure 8), perte évaluée à environ 96 % de l'activité initiale. Signalons toutefois, bien que celà ne change absolument rien à l'ampleur du phénomène que les activités ainsi mesurées ne sont pas réellement des V_{max} pour deux raisons :

a) en raison d'une inhibition par excès de substrat, le L(+)lactate, les activitées moléculaires (turnover number) de l'enzyme natif sont mesurées à une concentration de L(+)lactate (10 mM) correspondant au creux de la courbe $1/v = f(1/s)$. Les vraies valeurs de V_{max} ne sont donc jamais atteintes. On peut néanmoins les extrapoler graphiquement (le rapport v_{10mM}/V_{max} est d'environ 0.9).

b) en raison de l'augmentation du K_m lactate après protéolyse (passage de 1 mM à 2,5 mM) (voir tableau page 126), la concentration en L(+)lactate pseudo-saturante avant protéolyse ne peut plus être considérée comme telle après protéolyse.

Il a toutefois été vérifié que la concentration en ferricyanure demeurait saturante au cours de cette coupure. En ce qui concerne le phénomène d'inhibition

par excès de substrat, une importante augmentation du K_L (constante apparente de dissociation du L(+)lactate agissant comme inhibiteur par excès) peut également être corrélée à la coupure trypsique H → α_T + β'_T (passage de 45 mM à 500 mM).

Ces différentes altérations fonctionnelles ne sont pas significativement agravées par le processus de dénaturation-renaturation que nous avons mis en oeuvre pour la séparation des deux fragments α_T et β'_T, les valeurs de K_m lactate, de V_{max} et de K_L de la forme $\alpha_T\beta'_T$ renaturée n'étant pas significativement différentes des valeurs respectives trouvées pour la même forme, non dénaturée.

B - Modulation de la perte d'activité selon le type de coupure chez le H-flavocytochrome b_2

- coupure clostripaïque

L'entité moléculaire $\alpha_c\beta_c$ résultant de la coupure clostripaïque présente un V_{max} (260 s^{-1}) et un K_L lactate (170 mM) significativement différents à la fois de l'enzyme natif et de la forme $\alpha\beta'$ trypsique (voir tableau 1 , article IV). Ceci montre que tout clivage de la zone "a" n'est pas équivalent du point de vue fonctionnel.

Rappelons que pour cette espèce clostripaïque, l'étude des propriétés fonctionnelles a été faite après un processus de dénaturation-renaturation tel que celui évoqué plus haut. Ceci ne doit en aucune façon jeter un doute sur l'interprétation des résultats. En effet, comme nous venons de le voir, ce processus, dans le cas de la forme $\alpha\beta'$ trypsique n'induit pas de modifications significatives des paramètres cinétiques. Il en est de même pour le cas du H-flavocytochrome b_2 non coupé (voir tableau 1 , article IV).

De fait la courbe : activité du H-flavocytochrome b_2 au cours de la protéolyse clostripaïque = f (concentration en protomère non coupé, tentativement établie par Corazzin (250) s'extrapole à concentration nulle en chaîne intacte à une valeur d'activité moléculaire voisine de celle obtenue pour la forme renaturée à la même concentration de L(+)lactate qu'on peut déduire de la courbe 6B article IV.

- Renaturations croisées

Ainsi qu'il a été montré dans l'article IV, la renaturation d'espèces mixtes trypsique/clostripaïque a permis de définir la zone qui semble être essentielle dans le maintien d'une forte activité. Il s'agit d'un peptide de 5 acides aminés localisés à l'extrémité N-terminale de β.

La remarque faite dans le paragraphe précédent qui concerne l'élargissement des résultats trouvés pour les formes renaturées aux formes non dénaturées reste valable pour ces espèces mixtes.

C - Comparaison avec le S-flavocytochrome b_2

La différence d'activité entre la forme physiologique et la forme cristallisée du S-flavocytochrome est connue depuis longtemps (126). La comparaison des extrémités N et C terminales de ces deux formes indiquait qu'elles différaient non seulement par la coupure dans la zone "a" mais également par une perte de peptides à leur extrémité N-terminale (168).

Ce n'est que plus tard qu'il fut montré par Pompon et Lederer (215) qu'une coupure chymotrypsique d'une liaison peptidique de la zone "a" coupure en apparence unique (les acides aminés N et C terminaux étant respectivement semblables dans la forme intacte et la forme résultante) suffisait à produire une importante perte d'activité (50 %). La figure 8 article IV précise la localisation de cette coupure.

D'autres travaux de Ghrir et Lederer (265) ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'autres formes coupées dans la région "a" dans la partie située à gauche du site de coupure par la protéase V_8 (voir figure 8 article IV). Toutes ces formes présentent une activité diminuée par rapport à l'enzyme non clivé. La perte maximale enregistrée n'est cependant que de 70 %.

La seule perte d'activité dramatique liée à une protéolyse ménagée du S-flavocytochrome b_2 (perte de 95 ou 94 %) est celle que nous avons enregistrée dans l'article II et qui a été correllée à la perte d'environ 25 résidus sur le fragment β.

L'extrémité C-terminale du fragment β semblant inaccessible aux protéases dans l''enzyme natif (199,215), il est raisonnable de penser que les résidus perdus lors de la trypsinolyse de la forme cristallisée appartenaient à l'extrémité N-terminale du fragment β . Cette hypothèse est compatible avec la séquence de cette région, puisqu'une arginine que l'on retrouve dans le H-flavocytochrome b_2 (au deuxième site de clivage par la clostripaine = Cl_2) est en position 6 et une lysine qui n'existe pas dans le H-flavocytochrome b_2 et qui est peut être accessible est en position 1 (la numérotation est celle adoptée figure 8, p 98).

En conclusion en ce qui concerne la zone "a" nous pouvons dire que toute coupure dans cette zone qu'elle soit ponctuelle ou non a pour conséquence de diminuer l'activité mais que la perte d'un peptide localisé à l'extrémité N-terminale de β semble la cause des altérations fonctionnelles majeures chez les deux flavocytochromes b_2.

2 - Coupure protéolytique dans la zone "cd"

L'évaluation de l'importance de la coupure protéolytique de la zone "cd" sur l'activité du flavocytochrome b_2 ne pouvait pas aisément se déduire de l'étude de l'espèce trypsique $(\varepsilon\beta')_4$, cette espèce ayant subi une coupure préalable dans la zone "a". Il m'a donc semblé particulièrement utile, pour aborder ce problème, d'obtenir une flavodéshydrogénase n'ayant pas subi cette coupure préalable. Ainsi qu'il a été déjà mentionné une espèce de ce type nommée P_1, avait été détectée par Baudras et Labeyrie (169) comme contaminant de certaines préparations. Il ne fut cependant pas possible de reproduire de telles préparations, et a fortiori d'étudier les propriétés de cette arlésienne de laboratoire.

La tactique choisie fut donc de chercher une protéase qui couperait de façon prioritaire la zone "cd". Ceci s'est avéré très difficile en raison de la longueur relativement importante de la zone "a" (273) et semble-t-il de sa toute particulière accessibilité. Après de nombreux échecs dont certains relevaient d'une hypothèse vraisemblablement fausse (la supposition qu'il n'y avait pas de résidus lysine dans la zone "a" du H-flavocytochrome b_2) j'ai pu trouver une protéase à spécificité très étroite -la protéase I de S.aureus V8- induisant prioritairement une coupure dans la zone "cd".

Cette coupure a pour effet la dissociation du globule cytochromique n (PM 11 000) d'une flavoprotéine "intacte". Malheureusement cette flavoprotéine n'est pas stable en ce sens qu'elle subit à son tour d'autres coupures en fragments probablement homologues aux fragments ε et β' trypsiques. Son isolement est cependant possible par les méthodes décrites dans l'article V.

Rappelons que cette flavoprotéine présente une importante activité lactate déshydrogénase dans le test standard "lactate-ferricyanure". Le Km lactate est égal à celui de l'enzyme natif mais le Km ferricyanure est augmenté d'un facteur 25. A saturation en cet accepteur, l'activité moléculaire atteint dans certaines préparations 80 % de celle du H-flavocytochrome b_2. Cette flavodéshydrogénase est inhibée par le L(+)lactate en excès ($K_L \sim 130$ mM) comme le flavocytochrome b_2. En définitive les propriétés de cette flavodéshydrogénase sont très voisines de celles du flavocytochrome b_2 en ce qui concerne la fonction lactate déshydrogénase. Ceci confirme que l'hème n'intervient pas dans l'expression de cette fonction.

L'un des autres points qui mérite le plus d'être noté est l'absence de transfert d'électrons entre cette flavodéshydrogénase et le noyau cytochromique b_2 lorsqu'ils ne sont plus liés covalemment. On peut penser que ce transfert nécessite, dans l'enzyme natif une orientation critique des deux groupes prosthétiques flavine et hème et que cette orientation ne peut être obtenue dans le cas des entités fonctionnelles séparées. De fait, ainsi qu'il a été montré dans les articles I,II et V, la coupure de la région "cd" est toujours accompagnée de la dissociation spontanée

des entités fonctionnelles. Un complexe stable entre elles ($K_d < 10^{-6}$M) n'existe donc pas. Ceci met en évidence l'importance du pont "cd". Il n'est cependant pas possible au vu de ces seules expériences de dire si c'est la coupure elle-même ou la perte du fragment "cd" qui joue le rôle primordial dans la dissociation des domaines fonctionnels et la perte de leur capacité à se transférer des électrons. Nous n'avons pas essayé par exemple de voir si la flavodéshydrogénase pouvait réduire le fragment α.

Le second point important est l'incapacité de cette flavodéshydrogénase à réduire le cytochrome c, qui est l'accepteur physiologique de l'enzyme natif. Ce point sera particulièrement évoqué dans le chapitre suivant.

Les propriétés de cette flavodéshydrogénase (FDHγ8) peuvent être comparées à celles de la flavodéshydrogénase trypsique (FDHT) dont les propriétés sont rappelées tableau 1 et à celles d'un dérivé déhémo du S-flavocytochrome b_2. A cet égard la déshydrogénase trypsique, du point de vue fonctionnel n'est qu'une version très altérée du domaine flavodéshydrogénase tel que nous l'avons isolé après protéolyse par la protéase de S.aureus V8. La coupure dans la zone "a" semble être la cause première de ces altérations.

La comparaison avec le dérivé déhémo du S-flavocytochrome b_2 sera évoquée dans la partie suivante. Un tel dérivé est en cours de préparation à partir du H-flavocytochrome b_2.

II - ANALYSE DES PROCESSUS REACTIONNELS MODIFIES :

Un bilan de l'état actuel des connaissances concernant le mécanisme réactionnel du flavocytochrome b_2 a été récemment dressé par F. Labeyrie (266). La réduction du flavocytochrome b_2 par le L(+)lactate compte un certain nombre d'étapes élémentaires successives impliquées ou non dans le turnover. Celles impliquées dans le turnover sont :

1/ le transfert de 2 e^- du L(+)lactate au FMN donnant une flavine réduite
2/ le transfert d'un électron de la flavine réduite à l'hème oxydé produisant une flavine semiquinone et un hème réduit.
3/ le transfert d'un électron de l'hème réduit à un accepteur.
4/ un deuxième transfert d'un électron de la flavine semiquinone pour régénérer la flavine oxydée permettant le début d'une nouvelle rotation.

Dans le H-flavocytochrome b_2, les deux étapes 1 et 2 sont limitantes ensemble (leurs constantes de vitesses sont peu différentes) (194). Les perturbations fonctionnelles mesurées à saturation de substrats suggèrent donc fortement qu'au moins une de ces étapes a été modifiée.

Table 2. Comparison of Kinetic Parameters of Intact and Cleaved H-Flavocytochrome b_2 [a]

		Intact	Cleaved at "a"	T-flavodehydrogenase[b]
Flavodehydrogenase function				
K_m L-lact	(mM)	1	2.5	50
K_I L-lact	(mM)	45	510	>2000
V_m/e[e]	(s^{-1})	950 (30°) 250 (5°)	40 (30°) 4 (5°)	14 (30°)
k_{max}[c] lact→flavin		300 (5°)	2-4 (5°)*	4.5 (10°)
Intramolecular electron transfer				
k_{max}[c] Flavin→heme b_2	(s^{-1})	350 (5°)	>350 (5°)	–
Flavocyt. b_2 or derivatives to cyt. c electron transfer				
steady state	(s^{-1})	230 (5°)	not determined	0
stopped flow	($M^{-1} s^{-1}$)	10^7-10^9[d] (5°)	"	0

[a] Measurements performed in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0; mean kinetic values
[b] Isolation of the T-flavodehydrogenase after cleavage at "a" and "cd"
[c] From stopped flow measurements
[d] Ionic strength dependent
[e] Ferricyanide activity

Tableau 1 : Comparaison des paramètres cinétiques du H-flavocytochrome b_2 (intact), de la forme $(\alpha_T\beta_T^1)_4$ (notée cleaved at "a") et de la flavodéshydrogénase trypsique (notée ici T-flavodéshydrogénase). (Gervais et al.(239); * : Blandin et al. (résultats non publiés).

A l'heure actuelle nous n'avons pas étudié en détail ce problème. Les seules informations préliminaires dont nous disposons concernent les espèces $\alpha\beta'$ trypsique et $\varepsilon\beta'$ trypsique.

Les résultats qui sont montrés dans le tableau 1 indiquent principalement deux choses :

- pour la forme $(\alpha\beta')_T$, au moins la première étape impliquée dans le turn over est ralentie d'un facteur ~ 100
- pour la forme $(\varepsilon\beta)$ la première étape est ralentie de la même façon.

Ainsi qu'il a été souligné dans l'article V les trois dérivés sans hème du flavocytochrome b_2 actuellement connus (FDH_{V8}, FDH_T et la forme déhémo du S-flavocytochrome b_2) se comportent de la même façon vis à vis du ferricyanure. Celui-ci en effet, dans les conditions d'essai standard n'est plus saturant pour aucun de ces dérivés. Iwatsubo et al. avaient montré, dans le cas du S-flavocytochrome b_2 que la fonction flavodéshydrogénase elle-même, au point de vue des relations avec le substrat n'était pas modifiée par la séparation de l'hème (même K_m lactate, même constante de vitesse du transfert lactate fixé $\longrightarrow$ flavine prosthétique). La modification portait uniquement sur l'affinité apparente pour le ferricyanure et pour le cytochrome c (ce dernier cessant de devenir accepteur). En ce qui concerne la flavodéshydrogénase FDH_{V8}, une étude par cinétique rapide n'a pas encore été entreprise.

En conclusion : le flavocytochrome b_2 est un enzyme constitué de deux entités fonctionnelles covalemment liées :

La première est une flavodéshydrogénase dont l'activité lactate déshydrogénasique peut être très perturbée par des coupures protéolytiques dans la zone "a" située au milieu de sa chaîne polypeptidique. Isolée, cette déshydrogénase ne transfère pas les électrons ni au cytochrome c, ni à son accepteur physiologique, le noyau cytochromique b_2 lorsque celui-ci ne lui est plus covalemment lié.

L'autre est un globule cytochromique qui une fois isolé conserve la faculté de transférer ses électrons au cytochrome c bien que de façon moins efficace qu'il ne fait dans l'enzyme natif (k_M-1_S^{-1} plus lents par 3 ordres de grandeurs) (262).

C H A P I T R E I V

LOCALISATION DU SITE DE FIXATION DU CYTOCHROME C SUR LE H-FLAVOCYTOCHROME B_2

ARTICLE VI : LOCALISATION OF THE MAIN ASSOCIATION AREAS BETWEEN FLAVOCYTOCHROME B_2 AND CYTOCHROME C BY FLUORESCENCE STUDIES.

GERVAIS, M., THOMAS, M.A., LABEYRIE, F., FAVAUDON, V. & POCHON, F. (1982)
in "Flavins and Flavoproteins". (ed. by V. Massey & C. Williams)
Elsevier North Holland pp. 838-837.

INTRODUCTION Chapitre IV

Lorsqu'un certain nombre d'éléments interagissent au sein d'un même complexe, l'une des premières étapes qui permette d'accéder à une meilleure compréhension de leur mode d'interaction consiste à établir les relations de voisinage de ces différents éléments. C'est ainsi qu'une véritable cartographie des protéines ribosomales a été établie (434).

Dans le cas, non plus d'un complexe multiprotéique mais d'un enzyme à plusieurs sous-unités, comme la cytochrome c oxidase, l'application du même principe peut être effectuée avec succès (435,436).

De la même façon,lorsque le biochimiste se trouve confronté à un couple de protéines qui forment un complexe, une légitime curiosité pousse celui-ci à investiguer les relations de proximité au sein de ce complexe.

Dans le cas du cytochrome c et du flavocytochrome b_2, dont l'association à faible force ionique était bien connue avant que ne débute ce travail (154), deux types de questions se posaient :

a) Quelle était la région du cytochrome c impliquée dans ce complexe ?

b) Avec quel(s) globule(s) du flavocytochrome b_2 cette région était-elle associée ?

Pour notre part, dans un premier temps, c'est surtout à ce second aspect du problème que nous nous sommes intéressés.

Les expériences susceptibles d'apporter des éléments de réponse à cette question pouvaient se concevoir a priori de deux façons selon que l'on choisise de travailler sur l'enzyme natif ou sur les fragments isolés.

Ainsi sur l'enzyme natif, il était envisageable :
- ou bien d'effectuer un marquage chimique sélectif suivi de l'analyse des effets de ce marquage sur les propriétés cinétiques du complexe b_2-c
- ou bien de réaliser un pontage des deux cytochromes suivi de protéolyse.

Sur les fragments isolés il était également possible :
- ou bien d'étudier l'éventuelle capacité de ces fragments à transférer des électrons au cytochrome c
- ou bien de tester, par filtration moléculaire par exemple leur capacité à former un complexe avec celui-ci.
- ou bien d'introduire une sonde spectroscopique dans le système.

C'est cette dernière solution qui a été adoptée pour les raisons suivantes :
a) partir de l'enzyme natif nous semblait exiger un investissement trop important pour un résultat au demeurant très aléatoire au moins pour la première des possibilités évoquées.
b) nous étions conscients qu'une éventuelle incapacité d'un des fragments du flavocytochrome b_2 à transférer des électrons au cytochrome c ne signifiait pas obligatoirement l'absence de complexe entre eux
c) la recherche, par filtration moléculaire d'un complexe entre le noyau cytochromique b_2 et le cytochrome c (Groudinsky, Labeyrie et Gervais, Résultats non publiés) et (225), ou entre la flavodéshydrogénase trypsique (FDH_T) et le cytochrome c (225) s'était toujours révélée infructueuse.

Signalons au passage qu'une des démarches que nous avions exclues est actuellement tentée au laboratoire par C. Blandin. Il s'agit du pontage du cytochrome c avec le flavocytochrome b_2 natif. L'aspect cinétique des interactions du cytochrome c avec les fragments du flavocytochrome b_2 est également en cours d'étude par Blandin-Capeillère et Albani.

Lorsque l'étude de l'interaction cytochrome c - protéine implique l'emploi d'une sonde, il est relativement rare que ce soit le partenaire du cytochrome c qui en soit le support (437) ou qu'elle soit introduite directement au niveau du complexe préformé (438). Dans la majorité des cas, c'est le cytochrome c lui-même qui est modifié, que cette sonde soit un agent chimique "simple" (363-365, 439-443), un agent pontant (444-447) ou d'une sonde spectroscopique du type hème modifié (448-449). Ceci est dû d'une part au fait que la chimie du cytochrome c est mieux connue que celle des protéines auxquelles il s'associe et d'autre part à l'illogisme que constituerait la localisation d'une sonde sur un élément dont on ne saurait pas a priori s'il est impliqué ou non dans une interaction avec le cytochrome c. Aussi, dans le cadre de notre étude nous avons également choisi de "marquer" le cytochrome c lui-même.

Le cytochrome c que nous avons utilisé est celui extrait de la levure Hansenula anomala dans lequel le fer de l'hème a été substitué par du zinc (449) selon un procédé précédemment décrit pour le cytochrome c de coeur de cheval. La porphyrine de zinc ainsi obtenue présente des propriétés de fluorescence particulières (449). Cette fluorescence est modifiée lorsque le Zn-cytochrome c se lie à ses oxydases ou ses réductases.

Le Zn-cytochrome c avait été utilisé par Vanderkooi et al, principalement dans le but d'évaluer les distances hème-hème lors de l'association cytochrome c-cytochrome c oxydase (450) et cytochrome c - S-flavocytochrome b_2 (261).

Pour notre part, nous avons utilisé le Zn-cytochrome c en tant que sonde de détection d'éventuels complexes avec plusieurs entités moléculaires obtenues par protéolyse du H-flavocytochrome b_2. Les résultats de cette étude seront discutés en fonction des connaissances actuelles concernant le mode d'interaction du cytochrome c avec des protéines autres que le flavocytochrome b_2.

Published 1982 by Elsevier North Holland, Inc.
Vincent Massey and Charles H. Williams, Editors
Flavins and Flavoproteins

CHAPTER 137

Localization of the Main Association Areas Between Flavocytochrome b_2 and Cytochrome c by Fluorescence Studies

M. Gervais,* M.A. Thomas,* F. Labeyrie,* V. Favaudon,† and F. Pochon†

**Centre de Génétique Moléculaire du CNRS - 91190 Gif-sur-Yvette, France; †Fondation Curie, Institut de Radium, Section de Biologie - 91405 Orsay, France*

Among the components of the mitochondrial electron transfer chain, cytochrome c, which is easily prepared in large quantities, was a good candidate for studies on the structural modes of association between two electron carrier proteins. For a c-type cytochrome, it was suggested that this association is controlled by an interaction between some of its positively-charged lysine residues and complementary negatively-charged groups on the respective oxidoreductases (1–3). Microsomal cytochrome b_5 itself exhibits a cluster of negative charges located on the surface around the heme in the region of most accessibility to the solvent, in contrast with the positively-charged belt of c-type cytochromes. This situation led Salemme (4) to propose a hypothetical structure for an intramolecular electron transfer complex between cytochrome b_5 and cytochrome c. Flavocytochrome b_2, a cytochrome c reductase detected only in yeast, is able to form a stable complex with cytochrome c (very likely its physiological acceptor) in particular at low ionic strength (5). It has been established in our laboratory that each protomer of the tetrameric flavocytochrome b_2 has its polypeptide chain folded into three "globules" (6), one of which, n, the cytochrome b_2 core, is a cytochrome b_5-like domain (7) and the two others, ε and β, form together the flavodehydrogenase domain (6).

In this communication, we present information concerning the localization, among these three n, ε, β globules, of the main areas involved in the association with cytochrome c and the stability of the complex that each forms. Instead of ferricytochrome c, we have used a fluorescent derivative, Zn^{2+} cytochrome c.

Materials and Methods

Hansenula anomala flavocytochrome b_2 was prepared according to (8); proteolytic derivatives of flavocytochrome b_2 were prepared according to the methods developed in our laboratory (6,9). These derivatives are: (1) the monomeric cytochrome core (n) and the tetrameric flavodehydrogenase (FDH_{V3}) which are the two functional moieties of this two-headed enzyme, (2) the monomeric α fragment which is formed by the covalent linkage of the cytochrome core (n) and the ε part of the flavodehydrogenase (6).

Zn-cyt.c was prepared by replacement of iron in Hansenula anomala ferricytochrome c by zinc as described by Vanderkooi et al. (10). Its concentration is measured using $\varepsilon_{418\ nm} = 117\ mM^{-1}cm^{-1}$ (11).

The quaternary structure of Zn-cyt.c was investigated by several methods: (1) polyacrylamide (15%) sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis patterns of Zn-cytochrome c and native cytochrome c show a single band with identical molecular weight ($\simeq 13000$ daltons), (2) determination of cyt.c/flavocyt.b_2 and Zn cyt.c/flavocyt.b_2 molar ratios in complexes isolated by molecular sieving in the same conditions gives a mean value twice as high as Zn-cyt.c. (3) In gel filtration, the comparison of elution volumes of Zn cyt.c and cyt.c led to an estimation of molecular weight twice as high for the former, (4) ultracentrifugation equilibrium sedimentation patterns of Zn cyt.c at low ionic strength exhibit a monodisperse behavior with MW ~ 26000. These results led us to the conclusion that Zn-cyt.c is a noncovalent dimer (possibilities of dimerization of cytochrome c itself have already been described.)

Fluorescence studies were carried out on a Farrand Mark 2 fluorimeter, at 10°C, using for Zn cyt.c: λ excitation: 545 nm, λ emission = 640 nm according to (10) in two different buffers: buffer A: 10 mM phosphate, 10 mM DL sodium lactate pH 7.2; buffer B: 150 mM phosphate, 10 mM DL sodium lactate, pH 7.2.

Results

Binding of Zn-Cytochrome c to Flavocytochrome b_2

Addition of flavocytochrome b_2 to a solution of Zn cytochrome c results in a decrease of Zn cytochrome c fluorescence intensity according to a typical titration curve which reaches a plateau (Figure 1). Before analyzing such a curve, we have to note that (1) in spite of the light sensitivity of Zn-cytochrome c (10), the loss of fluorescence intensity resulting from successive illuminations is less than 2% of the initial level at the end of each experiment; (2) correction for screening and reabsorbing inner effects of Zn cytochrome c and the fluorescent quenchers in the region of both excitation and emission is less than 2%; (3) the fluorescence spectrum of Zn cytochrome c when excited at 545 nm remains unchanged after addition of any quencher.

These remarks lead us to consider that the quenching of fluorescence observed for each presented experiment significantly demonstrates the existence of actual complexes between Zn-cytochrome c and flavocytochrome b_2 or its derivatives.

The best computer fitting in the case of flavocyt.b_2-Zn cyt.c complex gives $K_d = 10^{-7}$ M in buffer A (see the simulated curve, Figure 2). The stoichiometry (Figure 1 and Table 1) is one dimeric Zn cyt.c/protomer b_2. Such a value is different from that found by Vanderkooi et al. (12) for the complex horse heart Zn cyt.c-*S.cerevisiae* flavocyt.b_2 but is in accord with values independantly found by several authors for various cyt.c and *H.anomala* flavocyt.b_2 (6, 13, 14).

Binding of Zn Cytochrome c to Flavocytochrome b_2 Fragments

Flavocytochrome b_2 proteolytic fragments (n, α_c, α_T, FDH_{VR}) form complexes with cytochrome c, both at low ionic strength (Figures 1, 2) and high ionic

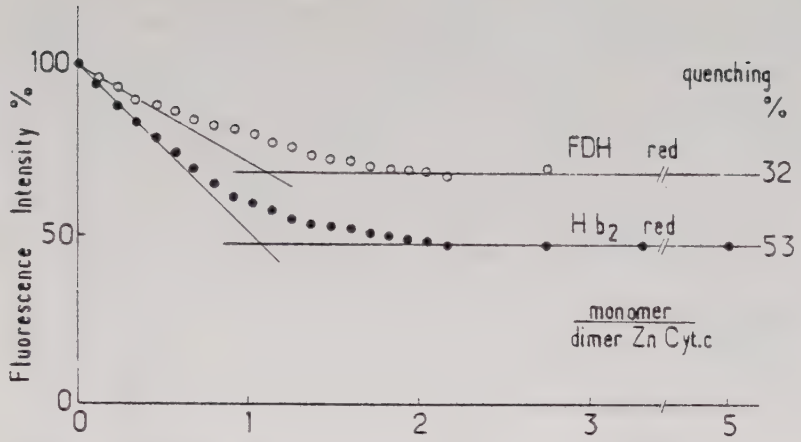

Figure 1. Fluorescence yield of Zn-cyt in presence of flavocytochrome b_2 (●) or its flavodehydrogenase derivative (○). (Zn cyt.c) = 2 μM, buffer A.

strength. In buffer A (I = 0.04), n excepted, all fragments lead to a titration curve very similar to that of the whole flavocytochrome b_2, while in buffer B (I = 0.46) we find for each of them a saturation curve similar to that of n in buffer A. The main results of the experiments are reported in Table 1.

Discussion

These data show the existence of two areas involved on flavocyt.b_2 for its association with Zn-cyt.c. One area has been localized on each of the two functional domains of flavocyt.b_2. If the association with the flavodehydrogenase is essentially electrostatic ($Z_A Z_B = -3$), the one with cyt.b_2 core does not present such a character ($Z_A Z_B = -1$). This is in accord with other results from our laboratory (15). Moreover, α_c and α_T fragments (uncleaved assembly of n and ε), the flavodehydrogenase V_8 (assembly of ε and β) and flavocytochrome b_2 present similar characteristics of association with cytochrome c (K_d and stoichiometry). We conclude that, in the biglobular flavodehydrogenase domain, the globule ε is sufficient to assure cytochrome c binding. It seems that the dimeric character of Zn cytochrome c does not play any role in the interaction with flavocytochrome b_2. This association does not depend on the quaternary structure of flavocytochrome b_2 since the same results are found with monomeric α fragments and flavodehydrogenase or flavocytochrome b_2 which are tetrameric species.

Finally, let us consider a possible relationship between the formation of flavocytochrome b_2-cytochrome c complex and the electron transfer that takes place between these two proteins. We have found a different quenching level of Zn cytochrome c by oxidized and reduced flavocytochrome b_2 as noticed by Vanderkooi et al. (12). Such a difference has been explained by these authors as due to different spectral overlaps between Zn cytochrome c emission and oxidized and reduced flavocytochrome b_2 absorbances (12). In fact, we have

836

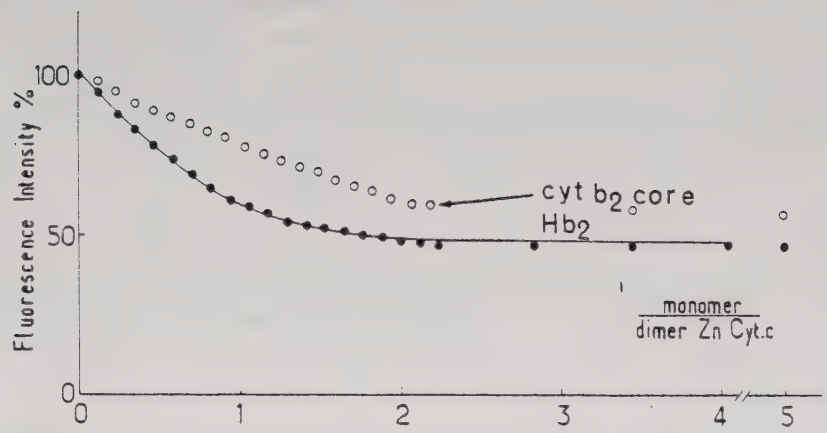

Figure 2. Fluorescence yield of Zn cyt.c in presence of flavocytochrome b_2 (●) or its cytochrome core (○) (Zn cyt.c)=2 μM, buffer A. The solid line corresponds to the simulated curve with $K_d = 10^{-7}$ M.

verified that, when sodium dithionite is used as a reductant, no difference in the quenching level could be observed for oxidized and reduced forms of flavocytochrome b_2. Actually, we only find some effect (9%) when lactate is the reducing agent. A control made with Zn cytochrome c alone in the presence of sodium lactate (DL or L+) leads us to conclude that the observed difference may be due to a direct lactate effect on Zn cytochrome c itself and not to the redox state of flavocytochrome b_2. Moreover, the existence of a similar quenching for the flavodehydrogenase (heme-free) and for the α_c fragment (heme carrying) indicates that the heme b_2-heme c energy transfer emphasized in (12) is probably not the only factor that provokes the quenching level observed.

Conclusion

In a recent work, it has been suggested that the same molecule of cytochrome c may interact with both subunits II and III of cytochrome oxidase (16). Our data concerning flavocytochrome b_2 (a cytochrome c reductase) and cytochrome c lead us to the same kind of conclusion. One interaction area has been localized on each of the two functional domains of flavocytochrome b_2, however the domain which does not seem to be able to transfer electrons to cytochrome c, the flavodehydrogenase domain, binds it with a high affinity, while the domain which transfers electrons to cytochrome c (cytochrome b_2 core) (14) is the domain that makes the minor contribution to the stabilization of the complex. Flavocytochrome b_2 was already proposed to result from a gene-fusion between ancestral genes coding for a cytochrome and a flavodehydrogenase. The above-evoked paradox might justify a selective advantage for such a gene-fusion.

Table 1. Fluorimetric study of complex formation between Zn-cyt.c and flavocytochrome b_2 or its Derivatives.

Species	Monomer/Dimer c at the equivalent point	% Quenching (plateau)	$K_d(\mu M)$ (10 mM phosphate)	$K_d(\mu M)$ (150 mM phosphate)
H	1.1 ± 0.1	53 ± 2	0.1	4
FDH V_8	1.1 ± 0.1	32 ± 2	0.1–0.2	3
α_C	1.0 ± 0.1	34 ± 2	0.1	4
α_T	1.0 ± 0.1	52 ± 2	0.15	3
η_T	[a]	[a]	$\simeq 1$	$\simeq 3$

[a] In spite of the absence of an actual plateau these curves were fitted with a quenching value of 52% which corresponds to the quenching observed for H and α_T.

H: *H.anomala* "intact" flavocty.b_2; T: trypsic; C: clostripaic.

References

1. Hettinger, T.P. and Harbury, H.A. (1965) *Biochem* 4:2585–2589.
2. Wada, K. and Okunuku, K. (1969) *J Biochem* 66:249–262.
3. Smith, L. and Minnaert, K. (1965) *Biochim Biophys Acta* 105:1–14.
4. Salemme, F.R. (1976) *J Mol Biol* 102:563–568.
5. Baudras, A. (1973) In *Dynamic Aspects of Conformation Changes in Biological Macromolecules.* Sadron, C. (ed.) Dordrecht-Holland: D. Reidel Publ. Co., pp. 181–205.
6. Gervais, M., Groudinsky, O., Risler, Y., and Labeyrie, F. (1977) *Biochem Biophys Res Comm* 77:1543–1551.
7. Guiard, B., Groudinsky, O., and Lederer, F. (1974) *Proc Nat Acad Sci USA* 71:2539–2543.
8. Labeyrie, F., Baudras, A., and Lederer, F. (1978) In *Methods in Enzymology*. Vol. 53. Fleischer, S. and Packer, L. (eds.) New York: Academic Press, pp. 238–256.
9. Gervais, M., Corazzin, S., Risler, Y., and Labeyrie, F., unpublished results.
10. Vanderkooi, J.M., Adar, F., and Erecinska, M. (1976) *Eur J Biochm* 64:381–387.
11. Thomas, M.A. and Favaudon, V., unpublished results.
12. Vanderkooi, J.M., Glatz, P., Casadei, J., and Woodrow, G.V. III. (1980) *Eur J Biochem* 110:189–196.
13. Prats, M. (1977) *Biochimie* 59:621–626.
14. Capeillère-Blandin, C., Iwatsubo, M., Testylier, G., and Labeyrie, F. (1980) In *Flavins and Flavoproteins.* Yagi, K. and Yamano, T. (eds.) Baltimore: University Park Press, pp. 617–620.
15. Capeillère-Blandin, C., personal communication.
16. Moreland, R.B. and Dockter, M. E. (1981) *Biochem Biophys Res Comm* 99:339–346.

DISCUSSION Chapitre IV

Le problème des interactions flavocytochrome b_2-cytochrome c, que ce soit en solution (220,225,226,243,249,262) ou dans les cristaux (268) a suscité ces dernières années de nombreux travaux.

La localisation, sur le flavocytochrome b_2, des aires impliquées dans l'association de ces deux cytochromes demeurait cependant un des points non encore élucidés.

A priori, en raison du rôle obligatoire joué par l'hème du S-flavocytochrome b_2 dans le transfert d'électrons vers le cytochrome c (220), il paraissait hautement probable que ces aires soient localisées sur le domaine hémique (globule n). L'absence d'activité lactate-cytochrome c réductasique des deux flavodéshydrogénases FDH_T et FDH_{V8} préparées à partir du H-flavocytochrome b_2 (voir chapitre I et III) allait dans le même sens.

Le principal argument en faveur d'une telle hypothèse résidait sans doute dans le modèle d'association cytochrome b_5-cytochrome c proposé par Salemme (451). En raison de l'homologie de séquence entre noyau cytochromique b_2 et cytochrome b_5 (186) et de leurs repliements supposés identiques (186), il était tentant d'extrapoler le modèle de Salemme en considérant que cytochrome b_5 et noyau cytochromique b_2 étaient totalement équivalents.

Dans l'article précédent a été présentée une méthode permettant d'obtenir des informations directes sur les aires d'association du H-flavocytochrome b_2 avec le cytochrome c. Je rappelerai brièvement les principaux résultats qui en découlent ; j'évoquerai ensuite les limites d'une telle méthode ainsi que le mode d'association du cytochrome c avec d'autres protéines. Nous verrons enfin s'il est possible à la lueur de ces résultats de mieux comprendre ce qui, dans l'association flavocytochrome b_2-cytochrome c, diffère des autres exemples connus.

A - LOCALISATION DES AIRES D'INTERACTION FLAVOCYTOCHROME b_2 - CYTOCHROME c

Ainsi que nous l'avons montré dans l'article, le Zn-cytochrome c se fixe avec une affinité quasiment identique sur le H-flavocytochrome b_2 et deux de ses fragments : le fragment α (qu'il ait été préparé par protéolyse trypsique ou clostripaïque) et le fragment FDH_{V8} (K_d = 0,1 - 0,2 µM en tampon phosphate 10 mM). La même valeur a également été trouvé pour FDH_T (Thomas et al, résultats non publiés). La meilleure hypothèse découlant de ces résultats est que l'aire d'association de forte affinité ainsi mise en évidence est localisée sur le fragment ε , qui constitue la partie commune aux espèces de type α et FDH.

Une seconde aire d'association avec le Zn-cytochrome c, d'affinité plus faible ($K_d \sim$ 2 µM en tampon 10 mM phosphate) est détectée sur le globule cytochromique n.

Ces résultats appellent un certain nombre de commentaires :

1/ Bien que l'étude directe de l'interaction du globule ε et du Zn-cytochrome c n'aie pas été réalisée (nous ne disposons pas encore de ce fragment à l'état isolé) il semble que ce globule joue un rôle primordial dans le flavocytochrome b_2 puisqu'il est indispensable à la fixation de la flavine (voir article III), qu'il porte le groupe sulfhydryl situé au site actif (248) et qu'il fixe le cytochrome c (ce travail).

2/ Bien qu'il soit monomère (article III) le fragment α fixe le Zn-cytochrome c avec la même affinité que le flavocytochrome b_2 natif. Il apparait donc que la fixation du cytochrome c est indépendante de l'état de polymérisation.

3/ La stoéchiométrie du complexe Zn-cytochrome c - H-flavocytochrome b_2 (à saturation) est de 8 Zn cytochrome c/tétramère b_2 soit 2 Zn-cytochrome c/monomère b_2. Cette valeur ne signifie pas que les deux aires d'association que nous avons mises en évidence, l'une sur ε, l'autre sur n fixent chacune un Zn-cytochrome c. En effet, la même stoechiométrie 2/1 est observée pour le complexe Zn cytochrome c - $FDH_{\gamma 8}$, bien que ce dernier fragment ne possède pas l'aire d'association portée par le globule n. De fait les expériences cinétiques faites avec le cytochrome c non modifié indiquent que le monomère du flavocytochrome b_2 ne peut fixer au maximum qu'un cytochrome c et un seul (249). Une étude visant à étudier plus en détail la structure quaternaire du cytochrome c (278) a montré en fait que le Zn-cytochrome c utilisé était un dimère non covalent.

La meilleure interprétation des résultats est donc que le H-flavocytochrome b_2 et ses fragments de type α ou FDH fixent un dimère Zn cytochrome c/monomère.

Notons au passage que le phénomène de la possible dimérisation des cytochromes c n'est pas nouveau. Il a déjà été observé dans le cas du cytochrome c natif (452) et on connait également des associations dimériques mixtes entre l'apoprotéine du cytochrome c et des fragments hémoprotéiques de 25 ou 38 résidus d'amino acides (453). Dans le cas du Zn-cytochrome c une telle dimérisation n'avait cependant pas été évoquée par les précédents utilisateurs de cette technique (261, 450).

4/ Les deux fragments α_c et α_T provoquent des taux d'extinction de la fluorescence du Zn-cytochrome c significativement différents. (34% et 52% respectivement)

Nous avons montré (article IV) que ces deux fragments différaient par un petit nombre de résidus d'acides aminés ($\alpha_c = \alpha_T$ + 900 daltons). On pourrait par conséquent penser qu'un groupement intervenant dans l'extinction de la fluorescence du Zn-cytochrome c manque dans le fragment α_T. Dans une telle hypothèse, la chaîne entière H devrait éteindre cette fluorescence comme α_c. Il n'en est rien. Le domaine des hypothèses reste donc tout à fait ouvert. On peut penser à un mouvement local d'un résidu de α_T ayant dans l'enzyme natif et dans α_T la même orientation et une orientation différente dans α_c et FDH.

5/ Il ne faut pas cacher que les résultats que nous avons présentés ne sont pas susceptibles, à eux seuls, d'apporter une réponse définitive au problème des interactions b_2-c. En particulier, en raison de son insolubilité en tampon usuel, le fragment β' n'a pas été étudié par cette méthode.

B - LIMITES DE LA METHODE UTILISEE

Les limites de la méthode dépendent essentiellement de deux facteurs :
1/ Le cytochrome c servant de sonde fluorescente n'est pas l'espèce native, puisque l'atome de fer a été remplacé par un atome de zinc (passage d'un état pentacoordinné à un état hexacoordinné).
2/ La structure d'un fragment protéique isolé peut être différente de la structure du même fragment dans l'enzyme natif ; en particulier des aires nouvelles non accessibles au solvant dans l'enzyme natif doivent se trouver dévoilées.

Nous allons reprendre successivement chacun de ces deux points :

1/ Le cytochrome c utilisé est un cytochrome c modifié :

Ainsi que nous l'avons évoqué plus haut, la structure quaternaire du Zn-cytochrome c n'est pas identique à celle du cytochrome c natif. Ce dernier est essentiellement monomérique. Le Zn-cytochrome c quant à lui est un dimère non covalent.

Cette dimérisation ne semble cependant pas un obstacle à l'interprétation des résultats. Le principal argument allant dans ce sens est que la valeur de la constante de dissociation du complexe Zn-cytochrome c - H-flavocytochrome b_2 (K_d = 0,1 µM) est du même ordre de grandeur que celle (K_d = 0,2 µM) déterminée dans des conditions expérimentales comparables pour le complexe du même flavocytochrome b_2 avec un cytochrome c non modifié (172).

2/ La structure d'un fragment isolé peut être différente de la structure du même fragment dans l'enzyme natif.

Il est concevable que la protéolyse ainsi que les traitements ultérieurs subis par certains fragments qui en sont issus provoquent des modifications de structure de ceux-ci, fussent-elles locales. Ceci est en particulier probable pour le fragment α qui, dans l'enzyme natif interagit fortement avec β (leur séparation nécessite un agent dissociant). (voir Article III).

Quoiqu'il en soit si de telles modifications ont affecté la structure des fragments α ou FDH, la meilleure hypothèse est que leur influence sur l'interaction de ces fragments avec le Zn-cytochrome c est inexistante, puisque les constantes de dissociation des complexes α-Zn cytochrome c et FDH-Zn cytochrome c sont identiques à celle du complexe H-flavocytochrome b_2 - Zn cytochrome c.

Dans le cas particulier du noyau cytochromique b_2 (globule n) qui présente vis à vis du Zn cytochrome c une aire de faible affinité ($K_d \sim 2$ µM en tampon 10 mM phosphate), la méthode utilisée ne permet pas a priori de dire si cette aire contribue effectivement à l'interaction avec le Zn-cytochrome c dans l'enzyme natif. Il est possible que cette aire corresponde à une région du noyau cytochromique qui s'est trouvée dévoilée lors de la dissociation de la flavodéshydrogénase.

En conclusion : le point fort qui se dégage de cette étude est la localisation du site principal de fixation du cytochrome c sur le domaine flavodéshydrogénase du flavocytochrome b_2. Le paradoxe qui en découle est le suivant : dans le flavocytochrome b_2 la partie qui est incapable de transférer les électrons au cytochrome c (partie flavodéshydrogénase) est celle qui le fixe avec une forte affinité tandis que celle qui lui transfère les électrons (noyau cytochromique b_2) ne participe -au maximum- que pour une faible part dans cette fixation. Pour mémoire, je citerai l'avantage sélectif évident qui résulterait, dans cette hypothèse de l'association sur une même chaîne polypeptidique des deux entités fonctionnelles flavodéshydrogénase et cytochrome de type b.

C - MODE D'ASSOCIATION DU CYTOCHROME c AVEC D'AUTRES PROTEINES

Les différents chercheurs qui se sont intéressés à la localisation des zones ou des résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction du cytochrome c avec ses oxidases ou ses réductases ont utilisé un petit nombre de méthodes qui sont principalement :

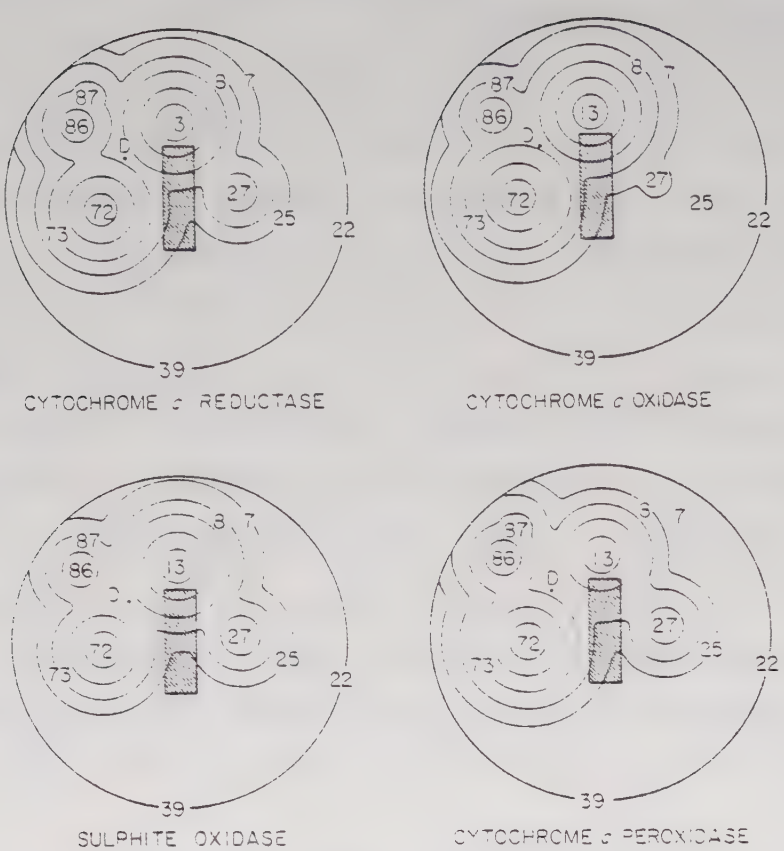

Figure 9 : Représentation schématique des aires d'interaction du cytochrome c avec la cytochrome c réductase et la cytochrome c oxidase de boeuf, la cytochrome c peroxidase de levure et la sulfite oxidase de boeuf selon (478).

a) des modifications chimiques suivies de l'analyse d'éventuelles perturbations fonctionnelles (363-365, 439, 441, etc)

b) des pontages (438, 444-447, 454-456, etc)

c) la mise en évidence des résidus protégés lors d'un marquage effectué sur un complexe préformé (457,458)

d) des calcul s sur ordinateur des modalités d'association les plus probables (451,459,475).

Ces méthodes ne seront pas détaillées ici. Les partenaires du cytochrome c ayant servi de support à ces études sont : l'ubiquinone cytochrome c oxidoréductase, la cytochrome c oxidase, la cytochrome c peroxidase, le cytochrome b_5, la flavodoxine, l'adrenodoxine et la sulfite oxidase.

Avant d'examiner plus en détails les résultats obtenus pour chacun des différents complexes je voudrais signaler que l'orientation de la molécule de cytochrome c que nous serons amenés à utiliser est une orientation classique (460) qui définit une face, un arrière, un côté droit et un côté gauche, le bord exposé de l'hème étant situé vers le lecteur.

1/ Cas de l'ubiquinone cytochrome c oxidoreductase

Ce complexe enzymatique (complexe III) est dans la mitochondrie la principale réductase du cytochrome c (461). Il présente vis à vis de celui-ci un seul site de forte affinité ($K_d \sim 10^{-8}$ M) (462). Ce site est localisé sur le cytochrome c_1 (365, 476), qui est un des éléments du complexe III. Il inclut les résidus lysines du cytochrome c suivants : 8, 13, 25, 27, 72, 79, 86 et 87 (458,462,463). Ces lysines sont situées sur la face avant du cytochrome c, autour de la crevasse de l'hème (voir figure 9).

2/ Cas de la cytochrome c oxidase

La cytochrome c oxidase est une oxydase physiologique du cytochrome c. Son unité monomérique qui est constituée de 7 sous-unités (464), présente deux sites de fixation pour le cytochrome c, d'affinités très différentes ($K_d \sim 10^{-8}$M et $\sim 10^{-6}$M respectivement) (461). Le site de haute affinité fait intervenir au moins deux sous-unités : la sous unité II (438,445,446) et la sous unité III (455,456). Il est probablement situé dans une crevasse entre ces deux sous-unités (447,455,461).

Les résidus du cytochrome c impliqués dans l'interaction avec la cytochrome c oxidase sont les mêmes (363,445,446,454,463) que ceux impliqués dans l'interaction avec le cytochrome c_1. L'arrière du cytochrome c interagit cependant lui aussi, ainsi qu'en témoigne le pontage de la cystéine 102 avec la sous-unité III (447,456).

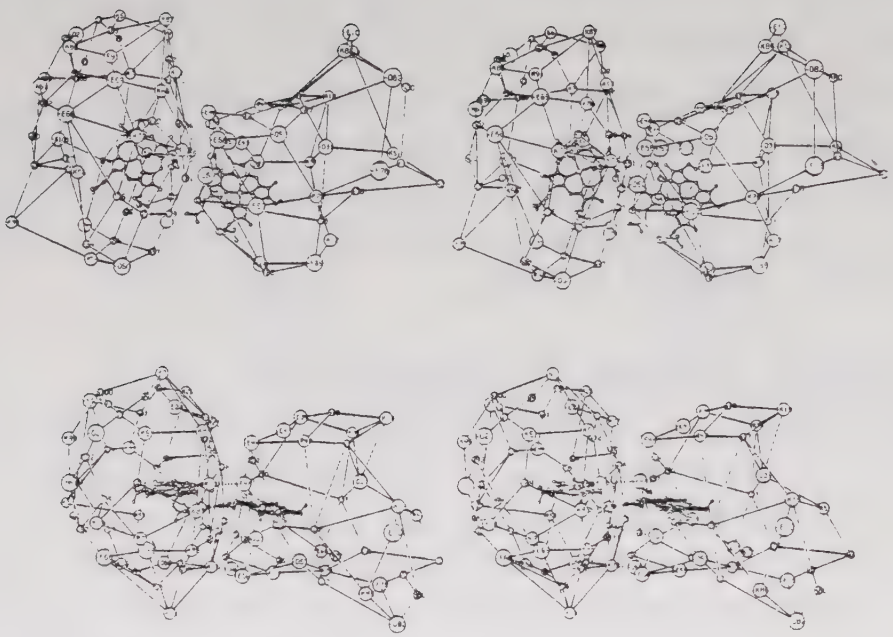

Figure 10: Modèle d'interaction du cytochrome c (à gauche dans les complexes) et du cytochrome b_5 (à droite) selon Salemme (451).
en haut : vue de côté
en bas : vue du dessus

3/ Cas de la cytochrome c peroxydase

La cytochrome c peroxydase de levure est une oxidase physiologique du cytochrome c. Elle peut fixer deux molécules de cytochrome c : l'une avec une forte affinité, l'autre avec une faible affinité (465). Le site de forte affinité est localisé du côté N-terminal de la chaîne de la peroxidase (444). Il fait intervenir une zone du cytochrome c comprenant les lysines 72, 86, 87, 13 et 27 mais non les lysines 8, 25 et 73 (439,466). L'ajustement, sur ordinateur des structures tridimentionnelles des deux protéines a confirmé ces résultats (475). La zone impliquée correspond, à peu de chose près à la zone du cytochrome c impliquée dans les complexes avec les oxidases et réductases précédemment décrites.

4/ Cas du cytochrome b_5

Le cytochrome b_5 est une réductase du cytochrome c qui forme un complexe avec celui-ci à faible force ionique (K_d = 0,25 10^{-6} M)(467). Le rôle physiologique d'un tel complexe demeure encore incertain (468).

Un modèle d'association du cytochrome c et du cytochrome b_5 fondé sur le meilleur ajustement des charges complémentaires et des encombrements stériques a été présenté par Salemme (451) (voir figure 10). Cette association fait intervenir la couronne de charges positives situées au niveau des lysines 13, 27, 72 et 79 du cytochrome c ainsi que les charges négatives des groupes carboxyl des résidus aspartique 48, glytamique 44, aspartique 60 et un propionate de l'hème du cytochrome b_5. Ce modèle a trouvé une confirmation quasiment totale en ce qui concerne la nature des lysines impliquées à la suite d'études par marquages chimiques (443,468,469) qui ont également montré que la lysine 8 n'était pas impliquée dans l'association. Une interaction supplémentaire fut envisagée entre la lysine 25 et le résidu glutamique 43 (468). On retrouve donc une nouvelle fois impliqués les résidus lysines localisés autour de la poche de l'hème du cytochrome c .

5/ Cas de la sulfite oxidase

La sulfite oxidase est une protéine localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie où elle est capable de réduire le cytochrome c (470). La constante de dissociation du complexe formé est faible (K_d = 10^{-7}M) (364). La zone du cytochrome c impliquée dans ce complexe est identique à celle déjà mise en évidence dans les cas précédents (lysines 8, 13, 25, 72, 79, 86 et 87) (364,471).

TABLE I

Sequence comparison between cytochrome b_5, sulfite oxidase core and cytochrome b_2 core

	1	5	10	15	20	25
b_5 (other species)	Asp Glu Asp Gly Arg		Arg	Glu Glu *Val* Lys	His Glu	*Ile* Val
b_5 (calf)	H Ser-Lys-Ala-Val-Lys-Tyr-Tyr-Thr-Leu-Glu-Glu-*Ile*-Glu-*Lys*-HIS-Asn-Asn-Ser-Lys-Ser-----					Thr-THR-*Leu*-Ile-Leu
	1	5	10	15		20
b_2 (yeast)	H-Lys Glu-Lys-Ile	Ser-Pro-Ala-Glu-*Val* Ala-*Lys*-HIS-Asn-Lys-Pro-Asp-Asp-----				Cys-THR-*Val*-Val-Ile
	1	5	10	15	20	25
SO (chicken)	H-Ala-Pro-Ser-Tyr-Pro-Arg-Tyr-Thr-Arg-Glu-Glu-*Val*-Gly-*Arg*-HIS-Arg-Ser-Pro-Glu-Glu-Arg-Val-THR-*Val*-Thr-His					

	30	35	40	45	50
b_5 (other species)	His Arg *Ile*	*Ile*	Asp ?		
b_5 (calf)	His-Tyr-Lys-*Val-Tyr*-ASP-*Leu*-THR-Lys-PHE-*Leu*-Glu-Glu-HIS-PRO-GLY-GLY-Glu-*Glu*-Val-*Leu*-Arg-Glu-Glu-ALA-GLY				
	25	30	35	40	45
b_2 (yeast)	Asn Gly Tyr *Val Tyr* ASP-*Leu* THR-Arg PHE *Leu*-Pro-Asn HIS-PRO-GLY-GLY-Glu-*Asp*-Val-*Ile*-Lys-Pro-Asn-ALA-GLY				
	30	35	40	45	50
SO (chicken)	Gly Thr Asp *Val Ile* ASP-*Val*-THR-Asp-PHE-*Val*-Glu-Leu-HIS-PRO-GLY-GLY-Pro-*Asp*-Lys-*Ile*-Leu-Leu-Ala-ALA-GLY				

	55	60	65	70		
b_5 (other species)		Asn	*Ile*			
b_5 (calf)	Gly-Asp-*Ala* Thr-Glu-Asp PHE-Glu-Asp-*Val*----------Gly-HIS-Ser-----Thr-Asp-*Ala*-Arg-Glu-Leu-Ser-Lys-Thr-Phe				Ala Met	Glu Tyr
	50	55	60	65		70
b_2 (yeast)	Lys-Asp-*Val* Thr-Ala-Ile-PHE-Glu-Pro-*Leu*----------HIS-Ala------Pro-Asn-*Val*-Ile-Asp-Lys-Tyr-Ile-Ala-Pro					
	55	60	63	70		75
SO (chicken)	Gly-Ala-*Leu*-----Glu-Pro-PHE-Trp-Ala-*Leu* Tyr-Ala-Val HIS-Gly-Glu-Pro-His-*Val*-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Tyr					
SO (rat)	Pro		Asx			

	75	80	85	90			
b_5 (other species)			Lys Pro Arg				
b_5 (calf)	--------Ile-*Ile*-GLY Glu-LEU-His-Pro-Asp Asp-Arg-Ser-Lys-*Ile*-Thr-Lys-Pro-Ser-Glu-Ser-OH						
	75	80	85	90		95	
b_2 (yeast)	Glu-Lys-Lys-*Leu*-GLY-Pro-LEU-Glu-Gly-Ser-Met-Pro-Pro-Glu-*Leu*-Val-Cys-Pro-Pro-Tyr-Ala-Pro-Gly-Glu-Thr-Lys-OH						
	80	85	90	95	97		
SO (chicken)	--------Lys-*Val*-GLY Glu-LEU-Ser-Pro-Asp-Glu-Ala-Pro-Ala-*Ala*-Pro-Asp-Ala-Glu-Asp-Pro-Phe-OH						

Tableau 2 : Comparaison des séquences du cytochrome b_5 et des "noyaux cytochromiques" de la sulfite oxidase et du flavocytochrome b_2 selon Guiard et Lederer (241).

6/ Cas de l'adrenodoxine

L'adrenodoxine est une protéine mitochondriale qui réduit le cytochrome c in vitro. Cette réduction n'est probablement pas physiologique de part les localisations différentes de ces deux protéines dans la mitochondrie (le cytochrome c du côté externe de la membrane interne, l'adrenodoxine du côté matrice) (472). Les lysines 13, 27, 72 et 79 du cytochrome c sont impliqués dans l'interaction avec cette réductase (473).

7/ Cas de la flavodoxine (459)

La flavodoxine est une réductase du cytochrome c, dont la structure aux rayons X est connue (399-401). La méthode utilisée par Salemme sur le couple b_5-c a été appliquée au complexe flavodoxine-cytochrome c. Le modèle proposé implique une interaction entre les quatre lysines 13, 25, 27, 79 du cytochrome c et une couronne de charges négatives (Glu 120, Glu 65, Glu 62 et Asp 58) de la flavodoxine. Dans cette association les deux coenzymes FMN et hème c sont très voisins (3,5 Å seulement entre le vinyl exposé de l'hème c et le CH_3 en position 8 du FMN). L'angle de leurs plans respectifs n'est que de 24°C.

En résumé, lorsqu'il intervient dans un complexe, le cytochrome c, dans sept cas sur sept, interagit avec son partenaire par la face avant, celle du bord exposé de l'hème, et plus particulièrement par ses lysines 13, 27 et 79.

D - REFLEXIONS SUR L'INTERACTION FLAVOCYTOCHROME b_2 - CYTOCHROME c

1/ Aires du flavocytochrome b_2

L'homologie de séquences entre la partie hémique du flavocytochrome b_2 et le cytochrome b_5 a été montrée par Guiard et coll (186). Cette homologie est compatible avec un repliement semblable de la chaîne polypeptidique pour les deux hémoprotéines. Cependant, les quatre charges du cytochrome b_5 impliquées dans l'association avec le cytochrome c ne se retrouvent pas toutes sur le noyau cytochromique b_2, tout au moins en ce qui concerne celui dont la séquence est connue (n_s) (voir tableau 2). Le résidu glutamique 44 est remplacé par un aspartique 41 et le propionate de l'hème est toujours présent mais les résidus aspartique 48 et 60 sont remplacés respectivement par la phénylalanine 45 et la proline 57 qui ne leur sont pas équivalents. Il est difficile a priori d'imaginer les résidus occupant ces positions dans le noyau cytochromique b_2 que nous avons utilisé et qui est préparé à partir du H-flavocytochrome b_2. Notons que dans le noyau sulfite de la sulfite oxidase de poulet les résidus en position équivalente aux résidus 48 et 60 du cytochrome b_5 de veau ne sont pas non plus conservatifs au sens fonctionnel du terme puisqu'il s'agit

respectivement d'une leucine et d'une alanine.

Rappelons d'autre part que le modèle de Salemme a été établi avec deux molécules sphériques monoglobulaires de tailles identiques. Dans le H-flavocytochrome b_2 on doit également tenir compte de la présence de ε et de β'.

Ces différentes observations rendent improbable une identité d'interactions entre flavocytochrome b_2 et cytochrome c d'Hansenula anomala d'une part et cytochrome b_5 de veau-cytochrome c de thon (modèle de Salemme) d'autre part.

En résumé, compte tenu du transfert d'électrons existant entre hème b_2 et hème c, un positionnement optimum des deux hèmes impliquant une proximité spatiale demeure très probable. Le fait cependant que ε possède l'aire principale de fixation du cytochrome c laisse supposer que c'est lui, et non pas le noyau cytochromique b_2 qui impose l'architecture globale du complexe.

2/ Aires du cytochrome c

La méthode que nous avons utilisée ne donne pas de renseignement sur les zones du cytochrome c impliquées dans l'association b_2-c. Des informations positives à ce sujet sont susceptibles d'être apportées par le travail de Blandin déjà cité.

Remarquons toutefois que :

a) le cytochrome c d'Hansenula anomala, dont la séquence est connue (474) ne présente pas de lysine en position 13. Le résidu qui le remplace est cependant équivalent du point de vue de la charge puisqu'il s'agit d'une arginine. La position 72 correspond quant à elle à une lysine triméthylée, équivalente du point de vue charge mais pas du point de vue stérique.

b) en raison de la probable proximité des deux hèmes c et b_2 évoquée plus haut, on pourrait imaginer que le cytochrome c puisse interagir avec ε comme il interagit avec la sous unité III de la cytochrome c oxidase, c'est à dire par sa face arrière (447,456). En faisant même abstraction d'une telle hypothèse un parallèle peut de toute façon être établi entre le flavocytochrome b_2 et l'oxydase puisque leur association au cytochrome c fait intervenir pour chacun d'eux 2 aires localisées sur des globules distincts.

Remarque : Le modèle d'association flavodoxine-cytochrome c est intéressant puisqu'il met en jeu une flavodoxine à FMN et le cytochrome c. L'absence de transfert flavodéshydrogénase → cytochrome c et l'existence du transfert heme b_2 → hème c ne rendent pas a priori un tel modèle applicable à l'interaction flavodéshydrogénase → cytochrome c dans le flavocytochrome b_2.

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

L'idée directrice de ce travail était, à propos d'un enzyme bifonctionnel, le flavocytochrome b_2, de reconstituer une sorte de puzzle dont seulement la moitié des morceaux était fournie au départ.

Ces morceaux constituaient un ensemble hétéroclite d'effecteurs (lactate, cytochrome c) , de coenzymes (FMN et hème), de fonctions au sens le plus large du terme (fonction cytochromique et flavodéshydrogénasique mais également fonction de maintien de la structure quaternaire).

Ma première démarche a été de compléter le jeu en cherchant la moitié absente, celle des éléments structuraux.

Le flavocytochrome b_2 n'étant constitué que d'un seul type de chaînes polypeptidiques, la non préexistance d'éléments structuraux séparés nécessitait d'en créer.

Cette partie du travail a été faite grâce à un découpage de la chaîne avec les outils adéquats,les protéases. Parmi elles ont été particulièrement utilisées la trypsine, la clostripeptidase B et la protéase de S.aureus V8. Les fragments issus des protéolyses ont été localisés sur un modèle linéaire de chaîne polypeptidique puis ils ont été séparés.

Tous les éléments étant ainsi réunis, le travail a consisté à determiner "quoi fait quoi".

Dans une large mesure, nous avons pu apporter à ces questions des réponses qui permettent de mieux comprendre comment est constitué et comment fonctionne le flavocytochrome b_2.

Il est d'usage dans une conclusion de tirer la substantifique moelle de son travail en montrant qu'un grand nombre de problèmes ont été résolus. Dans ce cas précis, il est vrai que nous pouvons proposer un modèle assez précis de ce que pourrait être la structure de la chaîne protomérique du flavocytochrome b_2 avec ses trois "globules", sa flavine prise en sandwich entre deux d'entre eux, sa région dite "non structurée" présentant un grand rôle fonctionnel, le manque apparent d'affinité entre les deux parties fonctionnelles, le cytochrome c ancré sur l'un des domaines fonctionnels mais incapable de réagir avec lui etc.

Il ne faudrait cependant pas croire que tous les problèmes sont résolus et le risque n'est pas très grand de parier que le flavocytochrome b_2 continuera encore à susciter de nombreuses recherches. Il est probable en particulier que l'utilisation des domaines fonctionnels isolés permettra de mieux cerner l'éventuel avantage sélectif de leur association dans l'enzyme natif. La connaissance de la séquence et de la structure tridimentionnelle seront également à n'en pas douter des étapes déterminantes dans la comprenension de cet enzyme.

1 - de BACKER, G. : Dictionnaire des Proverbes François avec l'explication de leurs significations et une partie de leur origine.
G. de Backer, imprimeur et marchand libraire "aux Trois Mores", Brusselles (1710).

TRAVAUX CONCERNANT L'OXYDATION DU L(+)LACTATE CHEZ LA LEVURE

2 - HARDEN, A. & NORRIS, R.V. : The reducing enzymes of dried yeast (Lebe deff) and of rabbit muscle.
Biochem. J. (1915) 9, 330.

3 - MEYERHOF, O. : Pflugers Arch. Ges. Physiol. (1919) 175, 20.

4 - FURTH, O. & LIEBEN, F. : Uber Milchsaurezerstorung durch Hefe und durch Blutzeller
Biochem. Z. (1922) 128, 144-178.

5 - FURTH, O. & LIEBEN, F. : Weitere untersuchungen uber Milchsaure zerstorung durch Hefe.
Biochem. Z. (1922) 132, 165-179.

6 - MEYERHOF, O. : Biochem. Z. (1925) 162, 43.

7 - HOFFERT, : Biochem. J. (1926) 20, 358.

8 - MEYERHOF, O. & LOHMANN, K. : Biochem. Z. (1926) 171, 421.

9 - BERNHEIM, F. : The specificity of the dehydrases. The separation of the citric acid dehydrase from liver and of the lactic acid dehydrase from yeast.
Biochem. J. (1928) 22, 1178-1191.

10 - BOYLAND, E. & BOYLAND, M.E. : Biochem. J. (1934) 28, 1417.

11 - ADLER, E. & MICHAELIS, M. : Z. Physiol. Chem. (1935) 235, 154.

12 - OGSTON, F.J. & GREEN, D.E. : Biochem. J. (1935) 29, 1983.

13 - GREEN, D.E. & BROSTEAUX : Biochem. J. (1936) 30, 1489.

14 - YAKUSHIJI, E. & MORI, T. : Acta Phytochim. Tokyo, (1937) 10, 113.

15 - LEHMANN, J. : Scand. Arch. Phys. (1938) 80, 237.

16 - DIXON, M. & ZERFAS, L.G. : Nature (London) (1939) 143, 557.

17 - BACH, S.J., DIXON, M. & KEILIN, D. : Nature, Lond. (1942) 149, 21.

18 - BACH, S.J., DIXON, M. & ZERFAS, L.G. : Nature, Lond. (1942) 48.

19 - HAAS, E., HORECKER, B.L. & HOGNESS, T.R. : Science (1942) 95, 406.

20 - BACH, S.J., DIXON, M. & ZERFAS, L.G. : Yeast Lactic Dehydrogenase and cytochrome b_2
Biochem. J. (1946) 40, 229-239.

21 - MAHLER, H.R. & HUENNEKENS, F.M. : Biochim. Biophys. Acta (1953) 11, 575.

22 - SLONIMSKI, P.P. : La formation des enzymes respiratoires chez la levure.
(1953) Masson, ed. (France).

23 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. : Crystalline cytochrome b_2 and lactic dehydrogenase of yeast.
Nature (1954) 173, 749-752.

24 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. : Abstracts Section N. Australian and New Zealand Association for the advancement of Science, Melbourne (1955).

25 - BOERI, E., CUTOLO, E., LUZZATI, M. & TOSI, L. : Preparation and properties of cytochrome b_2 from yeast.
Arch. Biochem. Biophys. (1955) 56, 487-499.

26 - DIXON, M. : Lactic dehydrogenase from yeast.
in Methods in Enzymology, Colowick, C.P. & Kaplan, N.O., eds. Vol. 1
Academic Press Inc, New York (1955) pp 444-449.

27 - GREEN, D.E. and BEINERT, H. : Ann. Rev. Biochem. (1955) 24, 1.

28 - MORTON, R.K. : The heart muscle succinic dehydrogenase and yeast lactic dehydrogenase systems.
Soc. Biol. Chem. India, Silver Jubilee Souvenir (1955) 177-185.

29 - BOERI, E. & TOSI, L. : Properties of cytochrome b_2 from yeast.
Arch. Biochim. Biophys. (1956) 60, 463-475.

30 - CHANCE, B., KLINGENBERG, M. & BOERI, E. : Cytochrome b_2 and b_5 systems.
Fed. Proc. (1956) 15, 231.

31 - DICKENS, F. & WILLIAMSON, D.H. : Nature Lond. (1956) 178, 1118.

32 - NYGAARD, A.P. : Purification and properties of yeast lactic dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta (1956) 30, 450.

33 - SLONIMSKI, P.P. : Adaptation respiratoire : développement du système hémoprotéiqu induit par l'oxygène.
Proced. 3rd. Inter. Congr. Biochem. Bruxelles, Acad. Press. New York (1956) pp. 242-252.

34 - APPLEBY, C.A. : Cytochrome-linked dehydrogenases.
Ph.D. Thesis. University of Melbourne (1957).

35 - BOERI, E. & CUTOLO, E. : Il potenziale di ossido-riduzione di preparati di citochromo b_2 aventi attivita lattico dreidrogenasica.
Bollottino della Societa italiana di biologia sperimentale (1957) 33, 1-3.

36 - CUTOLO, E. : Preparazione di citochromo b con attivita latticodeidrogenasica.
Bollotino della Societa italiana di biologia sperimentale (1957) 33

37 - GALZY, P. & SLONIMSKI, P.P. : Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acid lactique comme seule source de carbone.
C.R. Acad. Sciences, Paris (1957) 245, 2423-2426.

38 - GALZY, P. & SLONIMSKI, P.P. : Evolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone.
C.R. Acad. Sciences, Paris (1957) 245, 2556-2558.

39 - SIMMONDS, D.H., APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. : Aust. J. Sci. (1957) 20, 59.

40 - YAMASHITA, J., HIGASHI, T., YAMANAKA, T., NOKASI, M., MIZUSHIMA, H., MATSUBARA,H. HORIO, T. & OKUNUKI, K. : Preparation from baker's yeast of crystalline cytochrome b_2 having no lactic dehydrogenase activity.
Nature (1957) 179, 959-960.

41 - BOERI, E. & CUTOLO, E. : Abstr. Comm. 4th Int. Congress Biochem. Vienne (1958) n°5-36, p. 40.

42 - BOERI, E., CUTOLO, E. & SACCOMANI, R. : Sulle latticodreidrogenasi del lievito
Bol. Soc. Ital. Biol. Sperim.(1958) 301, 1887.

43 - DIXON, M. & WEBB, E.C. : in Enzymes ; Longmans, Green and Co. Ltd, London (1958) p.479.

44 - MARCUS, A. & VENNESLAND, B. : J. Amer. Chem. Soc. (1958) 80, 1123.

45 - MORTON, R.K. : Rev. Pure. Appl. Chem. (1958) 8, 161.

46 - NYGAARD, A.P. : Purification and properties of yeast lactic dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta (1958) 30, 450.

47 - OKUNUKI, K., HAGIHARA, B., SEKUZU, I. & HORIO,T. : Studies on cytochrome system. Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoti, Maruzen, Tokyo (1958) 264-272.

48 - SLONIMSKI, P.P. : Mutation et adaptation dans la formation des enzymes respiratoires chez la levure.
Bull. Soc. Fran. Physiol. Veg. (1958) 4, 125-135.

49 - SLONIMSKI, P.P. & TYSOROWSKI, W. : Sur l'existence de deux déshydrogénases lactiques chez la levure et sur la conversion au sein de la cellule de l'une en l'autre.
Compt. Rend. (1958) 246, 1111-1114.

50 - YAMANAKA, T., HORIO, T. & OKUNUKI, K. : Terminal oxidation system in yeast. I. On the role of action of cytochrome b_2.
J. Biochem. (1958) 45, 291-298.

51 - YAMANAKA, J., HORIO, T. & OKUNUKI, K. : Terminal oxidation system is respiring yeast. II. re-evaluation of role of action of cytochrome b_2 in dehydrogenations of lactate and malate.
J. Biochem. (1958) 45, 707-715.

52 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. Purification and crystallisation.
Biochem. J. (1959) 71, 492-499.

53 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. Enzymic and chemical properties of the crystalline enzyme.
Biochem. J. (1959) 73, 539-550.

54 - DIKSTEIN, S. : The active surface of yeast lactic acid dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta (1959) 36, 397-401.

55 - HORIO, T., YAMASHITA, J. & OKUNUKI, K. : Partial modification of bakers' yeast lactic dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta (1959) 32, 593-595.

56 - LABEYRIE, F., SLONIMSKI, P.P. & NASLIN, L. : Sur la différence de stéréospécificité entre la déshydrogénase lactique extraite de la levure anaérobie et celle extraite de la levure aérobie.
Biochim. Biophys. Acta (1959) 34, 262-265.

57 - NYGAARD, A.P. : Yeast lactic dehydrogenase : I. Purification and reaction properties.
Biochim. Biophys. Acta (1959) 33, 517-521.

58 - NYGAARD, A.P. : Lactic dehydrogenase of yeast : II. Different forms of the enzyme
Biochim. Biophys. Acta (1959) 35, 212-216.

59 - APPLEBY, C.A. & MORTON, R.K. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. The deoxyribose polynucleotide component and the physicochemical properties of the crystalline enzyme.
Biochem. J. (1960) 75, 258-269.

60 - APPLEBY, C.A., MORTON, R.K. & SIMMONDS, D.H. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. The amino acid composition of the crystalline enzyme.
Biochem. J. (1960) 75, 72-76.

61 - ARMSTRONG, J.McD, COATES, J.H. & MORTON, R.K. : Flavin dissociation and inactivation of cytochrome b_2 by oxygen.
Nature (1960) 186, 1033-1034.

62 - BAUDRAS, A., IWATSUBO, M. & LABEYRIE, F. : Groupes flaviniques des lacticodéshydrogenases de la levure.
Compt. Rend. Acad. Sci.(1960) 250, 2621-2623.

63 - GALZY, P. : Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone.
Compt. Rend. Acad. Sci. (1960) 250, 3719-3721.

64 - KATTERMANN, R. & SLONIMSKI, P.P. : Effet différentiel des analogues structuraux d'aminoacides sur la formation des enzymes respiratoires induite par l'oxygène.
Compt. Rend. Acad. Sci. (1960) 250, 220-

65 - LABEYRIE, F., NASLIN, L., CURDEL, A. & WURMSER, R. : Nouvelle détermination du potentiel d'oxydoréduction du système lactate-pyruvate.
Biochim. Biophys. Acta (1960) 41, 509-515.

66 - MONTAGUE, D. & MORTON, R.K. : Chemical and physical properties of the small deoxyribonucleic acid component of crystalline cytochrome b_2.
Nature (1960) 187, 916-

67 - NYGAARD, A.P. : Lactic dehydrogenase of yeast : III - A comparative study of the kinetic properties and the stability of two isolated forms of the enzyme.
Biochim. Biophys. Acta (1960) 40, 85-92.

68 - SINGER, T.P., KEARNEY, E.B., GREGOLIN, C., BOERI, E. & RIPPA, M. : On the multiplicity of lactic dehydrogenases in yeast.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1960) 3, 428-434.

69 - ARMSTRONG, J.Mc.D., & MORTON, R.K. : The bonding between the flavin group and apoprotein of cytochrome b_2.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, R.G. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Oxford (1961) pp. 569-572.

70 - BOERI, E. & CUTOLO, E.: The oxidation-reduction changes in the reaction of lactate with cytochrome b_2.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, G.R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Oxford (1961) pp. 568-569.

71 - BOERI, E. & RIPPA, M. : The effect of urea on flavocytochrome b_2.
Arch. Biochem. Biophys. (1961) 94, 336-341.

72 - BOERI, E. & RIPPA, M. : Conditions for the autoxidation of flavocytochrome b_2.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Inc New York (1961) pp. 524-533.

73 - CHANCE, B. : The kinetics of reduction of cytochrome b_2.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Oxford, (1961) pp. 565-568.

74 - GREGOLIN, C. & GHIRETTI-MAGALDI, A. : The lactic dehydrogenases of yeast.
II. The identification of the L(+)lactic dehydrogenase of petite yeast as cytochrome b_2.
Biochim. Biophys. Acta (1961) 54, 62-66.

75 - GREGOLIN, C., SINGER, T.P., KEARNEY, B. & BOERI, E. : The formation and enzymatic properties of the various lactic dehydrogenases of yeast.
Ann. N.Y. Acad. Sciences (1961) 94, 780-797.

76 - HASEGAWA, H. & OGURA, Y. : Kinetic studies on the action of yeast lactate dehydrogenase.
in "Haematin Enzymes" Falk, J.E., Lemberg, R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Inc. New York, (1961) pp. 534-543.

77 - HORIO, T. : Properties of intact and modified cytochrome b_2 : nature of baker's yeast lactate dehydrogenase.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, G.R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Ltd, Oxford (1961) pp. 560-565.

78 - HORIO, T., YAMSHITA, J., YAMANAKA, T., NOZAKI, M. & OKUNUKI, K. : Studies on baker's yeast lactate dehydrogenase.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Oxford (1961) pp. 552-560.

79 - MORTON, R.K. : Structure and properties of the flavohaemoprotein, cytochrome b_2 (L(+)lactate dehydrogenase of baker's yeast) and the haemoprotein, flavoprotein and apoprotein derivative).
Nature (1961) 192, 727-

80 - MORTON, R.K. & ARMSTRONG, J.Mc.D. : Flavin haem interaction in crystalline cytochrome b_2.
Proceedings of the Vth International Congress of Biochemistry. Moscow
Vol.V. Intracellular respiration. (1961) p.213.

81 - MORTON, R.K., ARMSTRONG, J.Mc.D. & APPLEBY, C.A. : The chemical and enzymic properties of cytochrome b_2 of baker's yeast.
in "Haematin Enzymes", Falk, J.E., Lemberg, R. & Morton, R.C. (eds)
Pergamon Press, New York (1961) pp. 501-523.

82 - MORTON, R.K. & SHEPLEY, K. : Crystallisation of cytochrome b_2 free of the deoxyribonucleic acid component.
Nature Lond. (1961) 192, 639-641.

83 - NYGAARD, A.P. : Various forms of yeast lactate dehydrogenase.
in "Haematin Enzymes', Falk, J.E., Lemberg, R. & Morton, R.K. (eds)
Pergamon Press, Inc. New York (1961) pp. 544-551.

84 - NYGAARD, A.P. : Various forms of D- and L-lactate dehydrogenase in yeast.
Annals of the New York Ac. Sc (1961) 94, 774-779.

85 - NYGAARD, A.P. : Induction of D(-) and L(+) lactic cytochrome c reductase in yeast.
J. Biol. Chem. (1961) 236, 1585-

86 - NYGAARD, A.P. : D(-) and L(+)lactic cytochrome c reductases of yeast : reversible interaction of inhibitors at the active sites.
J. Biol. Chem. (1961) 236, 2779-2782.

87 - RIPPA, M. : Preparation of crystalline flavocytochrome b_2.
Arch. Biochem. Biophys. (1961) 94, 333-335.

88 - BAUDRAS, A. : Flavocytochrome b_2 of baker's yeast : dissociation of flavin and reconstitution of lactic dehydrogenase activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1962) 7, 310-314.

89 - HASEGAWA , H. : J. Biochem. (1962) 52, 5-

90 - HASEGAWA, H. : J. Biochem. (1962) 52, 207-

91 - MAHLER, H.R. & da SILVA PEREIRA, A. : Properties of the DNA associated with crystalline yeast lactic dehydrogenase.
J. Mol. Biol. (1962) 5, 325-347.

92 - NYGAARD, A.P. : D- and L-lactic cytochrome c reductase and some related enzymes in S.cerevisiae.
Norvegian University Press (1962)

93 - NYGAARD, A.P. : D- and L-lactic cytochrome c reductases of yeast : interaction of polyvalent electrolytes at the acceptor sites.
J. Biol. Chem. (1962) 237, 742-745.

94 - SOMLO, M. : La L-lacticodéshydrogénase de la levure aérobie : Comparaison des propriétés de l'enzyme lié et de l'enzyme soluble.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 65, 333-346.

95 - YAMASHITA, J. & OKUNUKI, K. : Terminal oxidation system in baker's yeast. IV - cytochrome b_2 and yeast L-lactic dehydrogenase.
J. Biochem. (1962) 52, 117-124.

96 - ARMSTRONG , J.Mc.D., COATES, J.H. & MORTON, R.K. : Physicochemical studies of cytochrome b_2. Sedimentation, diffusion and electrophoresis of the crystalline deoxyribonucleoprotein.
Biochem. J. (1963) 86, 136-145.

97 - ARMSTRONG, J.Mc.D., COATES, J.H. & MORTON, R.K. : Physicochemical studies on cytochrome b_2. Some properties of modified forms of the enzyme and of the deoxyribonucleic acid component.
Biochem. J. (1963) 88, 266-

98 - CLERTANT, P. : Recherches sur le cytochrome b_2 d'une levure mutante pour le cytochrome c.
Diplôme d'Etudes Supérieures, Fac. Sci. Paris (1963).

99 - HINKSON, J.W. & MAHLER, H.R. : Studies on the mechanism of enzyme catalysed oxidation-reduction reactions. VI. Kinetic studies with yeast L-lactate dehydrogenase.
Biochemistry (1963) 2, 209-

100 - HINKSON, J.W. & MAHLER, H.R. : Studies on the mechanism of enzyme catalysed oxidation-reduction reactions. VII. pH effects on the kinetic of the reaction catalysed by yeast L-lactate dehydrogenase.
Biochemistry (1963) 2, 216-220.

101 - MORTON, R.K. & SHEPLEY, K. : The preparation of crystalline forms of ferricytochrome b_2 and ferrocytochrome b_2.
Biochem. J. (1963) 89, 257-262.

102 - MORTON, R.K. & SHEPLEY, K. : The flavin and haem prosthetic groups of cytochrome b_2 (L-lactate dehydrogenase of yeast).
Biochem. Z (1963) 338, 122-139.

103 - NYGAARD, A.P. : Lactate dehydrogenases of yeast.
in "The Enzymes" 2nd ed. (1963) Vol. 7, 557-565.

104 - NYGAARD, A.P. : in "Control mechanisms in respiration and fermentation" V. Wright, ed (1963) Ronald Press, New York, p. 27.

105 - RIPPA, M. & TRANIELLO, S. : Further experiments on the action of urea and oxygen upon cytochrome b_2.
The Italian Journal of Biochemistry (1963) 13, 209-219.

106 - SINGER, T.P. : Flavoprotein dehydrogenases of the electron-transport chain.
in "The Enzymes" 2n ed. (1963) vol. 7, p.345-382.

107 - LABEYRIE, F. & SLONIMSKI, P.P. : Mode d'action des lacticodéshydrogénases liées aux systèmes flaviniques et cytochromiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1964) 46, 1793-1828.

108 - MORTON, R.K. & STURTEVANT, J.M. : Kinetic investigation of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). I - The dehydrogenation of L-lactate in the presence and absence of ferricyanide as electron acceptor.
J. Biol. Chem. (1964) 239, 1614-1624.

109 - SOMLO, M. : The influence of lactate on the rate of synthesis of D- and L-lactate cytochrome c reductases in yeast.
6th International Congress of Biochemistry, New York, (1964).

110 - ARMSTRONG, J.Mc.D. : The oxidation of L-lactate by cytochrome b_2 of baker's yeast.
Annals. N.Y. Ac. Sciences (1965) 119, 877-887.

111 - BAUDRAS, A. : Groupes prosthetiques de la L-lacticodéshydrogénase de la levure. I - Mise en évidence du rôle de la flavine par l'étude des propriétés de l'apo-L-lacticodéshydrogénase.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) 47, 1143-1175.

112 - BAUDRAS, A. : Groupes prosthetiques de la L-lacticodéshydrogénase de la levure. II - Etude enzymatique de l'équilibre d'association de la flavine à l'hémoprotéine.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) 47, 1177-1201.

113 - BAUDRAS, A. : Groupes prosthetiques de la L-lacticodéshydrogénase de la levure. IV - Etude spectrophotométrique de l'oxydoréduction des groupes prosthétiques flavinique et cytochromique.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) 47, 1449-1466.

114 - HIROMI, K. & STURTEVANT, J.M. : Investigations of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). II - Anaerobic spectrophotometric and electron spin resonance titrations.
J. Biol. Chem. (1965) 240, 4662-4668.

115 - IWATSUBO, M. & di FRANCO, A. : Groupes prosthetiques de la L-lacticodéshydrogénase de la levure. III - Etude fluorométrique de la cinétique et de l'équilibre de combinaison du FMN à la partie protéique.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) 47, 891-910.

116 - JACKSON, J.F., KORNBERG, R.D., BERG, P., RAJBHANDARY, U.L., STUART, A., KHORANA, H.G. & KORNBERG, A. : On the heterogeneity of the deoxyribonucleic acid associated with crystalline yeast cytochrome b_2.
Biochim. Biophys. Acta (1965) 108, 243-248.

117 - MORTON, R.K. & SHEPLEY, K. : The formation and properties of a cytochrome c type haemoprotein (cytochrome b_2-haemoproteine 550) from cytochrome b_2.
Biochim. Biophys. Acta (1965) 96, 349-356.

118 - SOMLO, M. : Induction des lactico-cytochrome c reductases (D- et L-) de la levure aérobie par les lactates (D- et L-).
Biochim. Biophys. Acta (1965) 97, 183-201.

119 - SYMONS, R.H. : The DNA component of cytochrome b_2. I - Isolation of b_2 DNA and the behavior of cytochrome b_2 during chromatography on DEAE cellulose and sedimentation in a sucrose gradient.
Biochim. Biophys. Acta (1965) 103, 298-310.

120 - HIROMI, K. & STURTEVANT, J.M. : Cytochrome b_2.
in "Flavins and Flavoproteins" E.C. Slater, ed, Elsevier (1966) 283-303.

121 - LABEYRIE, F. : Propriétés des lactates oxydoréductases de la levure liées aux groupes prosthétiques flavinique et cytochromique.
Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. (1966) 12, 17-28.

122 - LABEYRIE, F., GROUDINSKY, O., JACQUOT-ARMAND, Y. & NASLIN, L. : Propriétés d'un noyau cytochromique b_2 résultant d'une protéolyse de la L-lactate cytochrome c oxydoréductase de la levure.
Biochim. Biophys. Acta (1966) 128, 492-503.

123 - NICHOLLS, R.G., ATKINSON, M.R., BURGOYNE, L.A. & SYMONS, R.H. : Changes in the properties of L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) from yeast during preparation of the crystalline enzyme.
Biochim. Biophys. Acta (1966) 122, 14-21.

124 - OGURA, Y. & NAKAMURA, T. : Kinetic studies on the oxidation and reduction of the protoheme moieties of yeast L(+)lactate dehydrogenase. J. Biochem. (1966) 60, 77-86.

125 - PRADINES, M. : Analyse des acteurs limitant in situ la respiration de la levure : oxydation du D et du L-lactate par les mutants de l'iso 2 cytochrome c. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Paris (1966).

126 - SOMLO, M. & SLONIMSKI, P.P. : Différences entre les propriétés de la L-lactico-déshydrogénase physiologique et la L-lacticodéshydrogénase cristallisée de la levure. Bull. Soc. Chim. Biol. (1966) 48, 1221-1249.

127 - SYMONS, R.H. & BURGOYNE, L.A. : L-lactate (cytochrome) dehydrogenase. in "Methods in Enzymology", Colowick, S.P. & Kaplan, eds, Academic Press, New York (1966) pp. 314-321.

128 - BURGOYNE, L.A., DYER, P.Y. & SYMONS, R.H. : On the molecular structure of crystalline yeast cytochrome b_2. J. Ultrastructure Research, (1967) 20, 20-32.

129 - IWATSUBO, M. & CAPEILLERE, C. : Cytochrome b_2 (L-lactate déshydrogénase) : équilibre et processus élémentaires de la réaction de combinaison du substrat à l'enzyme. Biochim. Biophys. Acta (1967) 146, 349-366.

130 - LABEYRIE, F., di FRANCO, A., IWATSUBO, M. & BAUDRAS, A. : FLuorometric and spectrophotometric study of heme binding on the apoprotein from a cytochrome b_2 derivative. Biochemistry (1967) 6, 1791-1797.

131 - LABEYRIE, F., GROUDINSKY, O., WATARI, H. : E.S.R. studies on cytochrome b_2. 7th Intern. Congress. of Biochemistry, Tokyo (1967) Abstract. F260.

132 - LABEYRIE, F. & SOMLO, M. : The three NAD-independant lactate dehydrogenases from S.cerevisiae. Colloque on Biochemical Evolution, Paris (1967) pp. 93-103.

133 - PAJOT, P., SHEPLEY PELL, K. & STURTEVANT, J.M. : Investigations of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) J. Biol. Chem. (1967) 242, 3555-3562.

134 - SOMLO, M. : Etude physiologique des trois lacticodéshydrogénases de la levure. Thèse de Doctorat d'Etat (1967).

135 - WATARI, H., GROUDINSKY, O. & LABEYRIE, F. : Electron spin resonance of cytochrome b_2 and of cytochrome b_2 core. Biochim. Biophys. Acta (1967) 131, 592-594.

136 - BAUDRAS, A. & LABEYRIE, F. : Reversible dissociation of cytochrome b_2 into subunits. in "Structure and Functions of cytochrome", Okunuki, K., Kamen, M.D. & Sekuzu, I. eds, University Park Press, Baltimore (1968) pp. 601-612.

137 - HIROMI, K. & STURTEVANT, J.M. : Free energy levels of heme and flavin of cytochrome b_2. in "Flavins and Flavoprotein" Yagi, K. ed. University of Tokyo Press, Tokyo (1968) pp. 58-70.

138 - IWATSUBO, M., BAUDRAS, A., di FRANCO, A., CAPEILLERE, C. & LABEYRIE, F. : Substrate binding and electron transfer in cytochrome b_2. in "Flavins and Flavoproteins", Yagi, K. ed. University Park Press, Baltimore (1968) pp. 41-58.

139 - IWATSUBO. M. & Di FRANCO, A. : Spectrofluorometric and spectropolarimetric studies of cytochrome b_2 and its derivatives. in "Structure and Function of cytochromes". Okunuki, K., Kamen, M.D. and Sekuzu, I. eds, Univ. of Tokyo Press and Univ. of Park Press (1968) pp. 613-625.

140 - PAJOT, P. : Investigation of cytochrome b_2. Ph.D. Yale University, New Haven, Connecticut, USA (1968).

141 - STURTEVANT, J.M. & TSONG, T.Y. : Investigations of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). IV - Optical rotatory dispersion. J. Biol. Chem. (1968) 2359-2366.

142 - CAPEILLERE-BLANDIN, C. : Interactions substrat-flavine-hémoprotéine et stabilité thermique du cytochrome b_2 (L-lactate déshydrogénase de la levure) FEBS Letters (1969) 4, 311-315.

143 - IWATSUBO, M. & RISLER, J.L. : Etude par dichroisme circulaire des interactions hème-flavine-proteine dans le cytochrome b_2 (L-lactate oxydoréductase) de la levure. Eur. J. Biochem. (1969) 9, 280-285.

144 - JACQ, C. : Structure C terminale du cytochrome b_2. Diplôme d'Etudes Approfondies d'Enzymologie (1969).

145 - STURTEVANT, J.M. & TSONG. T.Y. : Investigations of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). VI - Circular dichroism of the holoenzyme. J. Biol. Chem. (1969) 244, 4942-4950.

146 - TSONG, T.Y. & STURTEVANT, J.M.. : Investigation of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). V. Circular dichroism of the flavin mononucleotide free apoenzyme. J. Biol. Chem. (1969) 244, 2397-2402.

147 - JACQ, C. & LEDERER, F. : Molecular weight and quaternary structure of yeast L-lactate dehdyrogenase (cytochrome b_2). 1 - Minimum molecular weight from amino acid analyses. Eur. J. Biochem. (1970) 12, 154-157.

148 - MONTEILHET, C. & RISLER, J.L. : Molecular weight and quaternary structure of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). 3 - X-ray diffraction studies. Eur. J. Biochem. (1970) 12, 165-169.

149 - MORITA, A. & MIFUCHI, I. : Characterisation of respiration deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae lacking cytochromes a and c. Biochem. Biophys. Res. Comm (1970) 38, 191-196.

150 - PAJOT, P. & GROUDINSKY, O. : Molecular weight and quaternary structure of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). 2 - Revised heme extinction coefficients and minimal molecular weight. Eur. J. Biochem. (1970) 12, 158-164.

151 - SUZUKI, H. & OGURA, Y. : The kinetic behavior of the FMN and protoheme moieties of yeast L(+)lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). J. Biochem. (1970) 67, 277-289.

152 - SUZUKI, H. & OGURA, Y. : Effect of pH on the kinetic parameters of yeast L(+)lactate dehydrogenase (cytochrome b_2).
J. Biochem. (1970) 67, 291-295.

153 - BAUDRAS, A. : Pure L-lactate : cytochrome c oxidoreductase of the yeast Hansenula anomala offers new prospect for the study of intramolecular multielectron transfer.
Biochimie (1971) 53, 929-933.

154 - BAUDRAS, A., KRUPA, M. & LABEYRIE, F. : Molecular complexes between cytochrome b_2 (Yeast L(+)lactate : cytochrome c oxidoreductase) and cytochrome c in the crystalline state and in solution.
Eur. J. Biochem. (1971) 20, 58-64.

155 - BAUDRAS, A. & SPYRIDAKIS, A. : Etude de la L(+)lactate : cytochrome c oxydoreductase (cytochrome b_2) de la levure Hansenula anomala.
I - Préparation et caractérisation de l'enzyme pure.
Biochimie (1971) 53, 943-955.

156 - CLAVILLIER, L. : Etudes d'interactions génétiques dans la régulation pleiotrope de la biosynthèse des cytochromes (iso-1 cytochrome c, iso-2 cytochrome c, cytochrome b_2) chez la levure.
Thèse de Doctorat d'Etat, Paris (1971).

157 - FORESTIER, J.P. & BAUDRAS, A. : On the role of the prosthetic heme groups of cytochrome b_2 in the transfer of electrons from L-lactate to ferricyanide and cytochrome c.
in "Flavins and Flavoproteins", Kamin, H. ed. University Park Press, (1971) pp. 599-605.

158 - GROUDINSKY, O. : Study of heme-protein linkage in cytochrome b_2. Destruction of a crucial histidine residue by photooxidation of "apo" cytochrome b_2 core in the presence of rose Bengal.
Eur. J. Biochem. (1971) 18, 480-484.

159 - GROUDINSKY, O., JACQ, C., LABEYRIE, F., LEDERER, F., MONTEILHET, C., NINIO, M., PAJOT, P. & RISLER, J.L. : New developements concerning the quaternary structure of yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b_2).
in "Flavins and Flavoproteins", Kamin, H. ed, University Park Press, (1971) pp. 581-598.

160 - LEDERER, F. & JACQ, C. : Subunits of baker's yeast cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxidoreductase). 2 - End groups and origin of microheterogeneity.
Eur. J. Biochem. (1971) 20, 475-481.

161 - LEDERER, F. & SIMON, A.M. : Subunits of baker's yeast cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxidoreductase). 1 - Separation, molecular weight and amino acid analysis.
Eur. J. Biochem. (1971) 20, 469-474.

162 - MEVEL-NINIO, M., PAJOT, P. & LABEYRIE, F. : Reconstitution of cytochrome b_2 following prosthetic groups dissociation by guanidine hydrochloride; Protoheme binding.
Biochimie (1971) 53, 35-41.

163 - PAJOT, P. : Affinity of protoheme for the apoprotein of cytochrome b_2.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1971) 45, 887-892.

164 - RISLER, J.L. : Fluorescence and phosphorescence of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). Relative orientations of the prosthetic heme and flavin.
Biochemistry (1971) 10, 2664-2669.

165 - SPYRIDAKIS, A., NASLIN, L. & LABEYRIE, F. : Baker's yeast crystalline cytochrome b_2 : improved preparation and electrophoresis studies of subunit constitution.
Biochimie (1971) 53, 195-205.

166 - BAUDRAS, A., CAPEILLERE-BLANDIN, C., IWATSUBO. M. & LABEYRIE, F. : Formation of a stable complex between cytochrome b_2 and cytochrome c and study of its role in the overall electron transfer by rapid kinetics.
in "Structure and function of oxidation reduction enzymes" Akeson,A. & Ehrenberg, A.-eds, Pergamon Press, Oxford, and New York (1972) pp. 273-290.

167 - GROUDINSKY, O. : Caractérisation de la liaison hème-protéine du cytochrome b_2 de la levure par l'étude des propriétés physicochimiques du noyau cytochromique b_2.
Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. Paris Sud, Centre d'Orsay (1972).

168 - JACQ, C. & LEDERER, F. : Sur les deux formes moléculaires du cytochrome b_2 de Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. (1972) 25, 41-48.

169 - LABEYRIE, F. & BAUDRAS, A. : Difference in quaternary structure and constitutive chains between two homologous forms of cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxidoreductase).
Eur. J. Biochem. (1972) 25, 33-40.

170 - LEDERER, F. & JACQ, C. : Some properties of bakers' yeast physiological cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxidoreductase).
8th FEBS Meeting Amsterdam, Netherlans (1972) Abstr. 588.

171 - MEVEL-NINIO, M. : Subunit structure of L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) of Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. (1972) 25, 254-261.

172 - BAUDRAS, A. : Transitions reversibles d'activité et de structure quaternaire de la L(+)lactate : cytochrome c oxydoréductase (cytochrome b_2) de la levure Hansenula anomala.
in "Dynamic aspects of conformation changes in biological macromolecules" S. Sadron, ed. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht- Holland (1973) pp. 181-205.

173 - GUIARD, B. : Sequence de la fraction hémoprotéique du cytochrome b_2 de la levure Saccharomyces cerevisiae. Homologies avec le cytochrome b_5.
Thèse de Doctorat 3ème Cycle, Université Paris-Sud (1973).

174 - GUIARD, B., GROUDINSKY, O. & LEDERER, F. : Yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) chemical characterization of the heme binding core.
Eur. J. Biochem. (1973) 34, 241-247.

175 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : Structure of the heme binding site of bakers' yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2).
9th International Congress of Biochemistry, Stockholm (1973) Abst.2n7 p. 92.

176 - KELLER, R., GROUDINSKY, O. & WUTHRICH, K. : Proton magnetic resonances in cytochrome b_2 core. Structural similarities with cytochrome b_5.
Biochim. Biophys. Acta (1973) 328, 232-238.

177 - LEDERER, F. : On the mechanism of lactate oxidation by baker's yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2).
9th International Congress of Biochemistry, Stockholm (1973) Abstr.2d46, p. 59.

178 - LEMBERG, R. & BARRETT, : Cytochrome b_2 of yeast. L(+)lactate : cytochrome c oxidoreductase.
in"Cytochromes", Academic Press (1973).

179 - NASLIN, L., SPYRIDAKIS, A. & LABEYRIE, F. : A study of several bonds hypersensitive to proteases in a complex flavohemoenzyme, yeast flavocytochrome b_2. Modification of their reactivity with ligand induced conformational transitions.
Eur. J. Biochem. (1973) 34, 268-283.

180 - OLIVE, J., BARBOTIN, J.N. & RISLER, J.L. : The crystal and molecular structure of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2).
Int. J. Pept. Prot. Res. (1973) 5, 219-228.

181 - PAJOT, P.P. & CLAISSE, M.L. : Phosphorylation oxidative du lactate par la levure en présence d'antimycine A.
Réunion de la Société de Chimie Biologique. Symposium sur les mitochondries "Membranes mitochondriales-perméabilité et biogénèse" Grenoble (1973).

182 - PAJOT, P. & CLAISSE, M.L. : Antimycin resistant oxidative phosphorylation of lactate in yeast.
9th International Congress of Biochemistry, Stockholm (1973) Abstr. 4i6, p. 239.

183 - RISLER, J.L. : Etude de quelques propriétés structurales de la L-lactate déshydrogénase (cytochrome b_2) de la levure : structure quaternaire et relations spatiales entre l'hème et la flavine prosthétiques.
Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1973).

184 - RISLER, J.L. & GROUDINSKY, O. : Magnetic circular dichroïsm studies of cytochrome c and cytochrome b_2.
Eur. J. Biochem. (1973) 35, 201-205.

185 - CAPEILLERE-BLANDIN, C. : Caractérisation des transferts d'électrons au sein du flavocytochrome b_2.
Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. Paris-Sud, Centre d'Orsay (1974°.

186 - GUIARD, B., GROUDINSKY, O. & LEDERER, F. : Homology between baker's yeast cytochrome b_2 and liver microsomal cytochrome b_5.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71, 2539-2543.

187 - JACQ, C. & LEDERER, F. : Cytochrome b_2 from baker's yeast (L-lactate dehydrogenase) a double headed enzyme.
Eur. J. Biochem. (1974) 41, 311-320.

188 - LEDERER, F. : On the first steps of lactate oxidation by baker's yeast L(+)-lactate oxydoreductase (cytochrome b_2).
Eur. J. Biochem. (1974) 46, 393-399.

189 - PAJOT, P. & CLAISSE, M. : Utilisation by yeast of D-lactate and L-lactate as sources of energy in the presence of antimycin A.
Eur. J. Biochem. (1974) 49, 275-285.

TRAVAUX CONCERNANT LE FLAVOCYTOCHROME b_2 PUBLIES DEPUIS LE DEBUT DE CE TRAVAIL

190 - MULET, C. : Marquage d'affinité du cytochrome b_2. Preuves cinétiques que le bromopyruvate peut être employé comme marqueur d'affinité.
Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1974

191 - GERVAIS, M. : Contribution à l'étude des interactions cytochrome b_2 - cytochrome c par des mesures de potentiels red-ox.
Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1974

192 - JACQ, C. : Etude structurale d'un enzyme bifonctionnel : la L(+)lactate déshydrogénase (cytochrome b_2) de la levure. Relation entre les deux formes moléculaires de l'enzyme.
Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris VI (1974).

193 - CAPEILLERE-BLANDIN, C. : Flavocytochrome b_2 : simulation studies of the electron transfer reactions among the prosthetic groups.
Eur. J. Biochem. (1975) 56, 91-101.

194 - CAPEILLERE-BLANDIN, C., BRAY, R.C., IWATSUBO, M. & LABEYRIE, F. : Flavocytochrome b_2 : kinetic studies by absorbance and electron paramagnetic resonance spectroscopy of electron distribution among prosthetic groups.
Eur. J. Biochem. (1975) 54, 549-566.

195 - CAPEILLERE-BLANDIN, C., BRAY, R.C., IWATSUBO, M. & LABEYRIE, F. : Flavocytochrome b_2 : studies of intramolecular electron exchange between pros - thetic groups.
10th FEBS Meeting Paris (1975) Abstr. n°1248.

196 - CREMEL, G., PAJOT, P., GOUBAULT de BRUGIERE, J.F. & WAKSMAN, A. : Complex formation between yeast cytochrome b_2 and rat liver mitochondrial inner membrane.
10th FEBS Meeting Paris, (1975) Abstr. n°1058.

197 - DURLIAT, H., COMTAT, M. & MAHENC, J. : Dosage amperométrique du lactate à l'aide d'une électrode à enzyme.
J. Electroanal. Chem. (1975) 66, 73-76.

198 - GERVAIS, M., GROUDINSKY, O. & LABEYRIE, F. : Isolation of a tryptic flavoderivative of flavocytochrome b_2 preserving the site for the substrate.
10th FEBS Meeting Paris (1975) Abstr. n°1247.

199 - GUIARD, B., LEDERER, F. & JACQ, C. : More similarity between baker's yeast L(+)lactate dehydrogenase and liver microsomal cytochrome b_5.
Nature (1975) 255, 422-423.

200 - NINIO, M. : Propriétés structurales et fonctionnelles de dérivés du flavocytochrome b_2. Association de l'hème et/ou FMN aux chaînes combinées ou isolées.
Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay (1975).

201 - POMPON, D. : Etude du cytochrome b_2 par réticulation suivie de protéolyse.
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1975

202 - ALLIEL, P. : Marquage de résidus non essentiels par le bromopyruvate sur le cytochrome b_2 "cristallisé" - Stoechiométrie- Localisation - Identification.
Diplome d'Etudes Approfnodies, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1976

203 - BLAZY, B., THUSIUS, D. & BAUDRAS, A. : Mechanism of yeast cytochrome b_2 action. II - Steady state kinetics of oxalate inhibition.
Biochemistry (1976) 15, 257-261.

204 - CAPEILLERE-BLANDIN, C., IWATSUBO, M., LABEYRIE, F. & BRAY, R.C. : Flavocytochrome b_2 : studies of intramolecular electron exchange between prosthetic groups.
in "Flavins and Flavoproteins", T.P. Singer, ed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1976) pp. 621-634.

205 - CLAVILLIER, L., PERE-AUBERT, G., SOMLO, M. & SLONIMSKI, P.P. : Réseau d'interactions entre des gènes non liés : régulation synergique ou antagoniste de la synthèse de l'iso-1 cytochrome c, de l'iso-2 cytochrome c et du cytochrome b_2.
Biochimie, (1976) 58, 155-172.

206 - DURLIAT, H., COMTAT, M. & BAUDRAS, A. : Spectrophotometric and electrochemical determinations of L(+)lactate in blood using yeast lactate dehydrogenase.
Clinical Chemistry (1976) 22, 1802-1805.

207 - GERVAIS, M. : Structure triglobulaire du flavocytochrome b_2. Caractérisation des domaines flavodéshydrogénase et cytochrome séparés par la trypsine.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, (1976).

208 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : Complete amino acid sequence of the heme binding core in baker's yeast cytochrome b_2 L(+) lactate dehydrogenase.
Biochimie (1976) 58, 305-316.

209 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : Baker's yeast flavocytochrome b_2 (L(+)lactate dehydrogenase) : an immunological study of structure and function.
Eur. J. Biochem. (1976) 65, 537-542.

210 - LEDERER, F. : Complex formation between sulfite and flavin in bakers'yeast L-lactate dehydrogenase (flavocytochrome b_2).
10th International Congress Biochemistry, Hambourg (1976) Abstr.04-7-384.

211 - LEDERER, F. & MULET, C. : Affinity labelling of baker's yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) by bromopyruvate .
in "Flavins and Flavoproteins", Singer, T.P. ed, Academic Press, New York (1976) pp. 238-243.

212 - MATHEWS, F.S. & LEDERER, F. : Crystallographic study of bakers' yeast cytochrome b_2.
J. Mol. Biol. (1976) 102, 853-857.

213 - MULET, C. : Marquage d'affinité sur le cytochrome b_2.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, University Paris-Sud, Centre d'Orsay, (1976).

214 - PAJOT, P. : Fluorescence of proteins in 6M guanidine hydrochloride. A method for the quantitative determination of tryptophan.
Eur. J. Biochem. (1976) 63, 263-269.

215 - POMPON, D. & LEDERER, F. : Controlled proteolysis of flavocytochrome b_2. Characterization of a 15 000 d heme binding core and comparison with detergent solubilized cytochrome b_5.
Eur. J. Biochem. (1976) 68, 415-423.

216 - THUSIUS, D., BLAZY, B. & BAUDRAS, A. : Mechanism of yeast cytochrome b_2 action. I - Thermodynamics and relaxation kinetics of the interaction between cytochrome b_2 and oxalate.
Biochemistry (1976) 15, 250-256.

217 - GERVAIS, M., GROUDINSKY, O., RISLER, Y. & LABEYRIE, F. : Dissection of flavocytochrome b_2 -a bifunctional enzyme- into a cytochrome core and a flavoprotein molecule.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1977) 77, 1543-1551.

218 - GUIARD, B. : Une même unité hémoprotéique de type b_5 intégrée covalemment dans trois systèmes d'origine et de fonctions différentes.
Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1977).

219 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : The "b_5-like domain from chicken liver sulfite oxidase. A new case of common ancestral origin with liver cytochrome b_5 and baker's yeast cytochrome b_2 core.
Eur. J. Biochem. (1977) 74, 181-190.

220 - IWATSUBO, M., MEVEL-NINIO, M. & LABEYRIE, F. : Rapid kinetic studies of partial reactions in the heme free derivative of L-lactate cytochrome c oxidoreductase (flavocytochrome b_2) the flavodéshydrogénase function.
Biochemistry (1977) 16, 3558-3566.

221 - MEVEL-NINIO, M., RISLER, Y. & LABEYRIE, F. : Structural studies of yeast flavocytochrome b_2 : cooperative roles of the α and β globules in the formation of the flavin binding sites.
Eur. J. Biochem. (1977) 73, 131-140.

222 - MULET, C. & LEDERER, F. : Bromopyruvate as an affinity label for baker's yeast flavocytochrome b_2.
Eur. J. Biochem. (1977) 73, 443-447.

223 - POMPON, D. : Etude de l'effet isotopique en cinétique rapide du L(+)α^2H lactate sur le cytochrome b_2. Mise au point par simulation d'un nouveau schéma cinétique pour les transferts d'électrons.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1977).

224 - PRATS, M. : Proteolysis of L-(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b_2) extracted from Saccharomyces cerevisiae and Hansenula anomala yeasts.
Eur. J. Biochem. (1977) 75, 619-625.

225 - PRATS, M. : Complexes entre les L(+)lactate: cytochrome c oxydoreductase extraits des levures Saccharomyces cerevisiae ou Hansenula anomala et le cytochrome c de coeur de cheval.
Biochimie (1977) 59, 621-626.

226 - YOSHIMURA, T., MATSUSHIMA, A., AKI, K. & KAKIUCHI, K. : Formation of a complex between yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) and cytochrome c. Ultracentrifugal and gel chromatographic analyses.
Biochim; Biophys. Acta (1977) 492, 331-339.

227 - BAUDRAS, A. : Suitability of yeast lactate dehydrogenases (cytochrome b_2) for lactate determination.
Symposium on anaerobic metabolism and lactic acid (Soc. Eur. Cardiol.) Augère (Suisse) Springer Verlag (1978).

228 - BLAZY, B., BARDET, M. & BAUDRAS, A. : A standard high yield purification of L(+)lactate : cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b_2) from the yeast Hansenula anomala.
Analytical Biochem. (1978) 88, 624-633.

229 - GERVAIS, M., RISLER, Y., CAPEILLERE-BLANDIN, C., VERGNES, O. & LABEYRIE, F. : Proteolysis as a tool in structural and functional studies of yeast flavocytochrome b_2.
in "International Conference on Limited Proteolysis in Microorganisms" Bethesda, USA (1978).

230 - GHRIR, R. : Etude de la séquence de la partie C-terminale du cytochrome b_2 chymotrypsique de la levure Saccharomyces cerevisiae.
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, (1978).

231 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : Surface differences and similarities in two homologous proteins. Cytochrome b_5 and cytochrome b_2 core.
Biochim. Biophys. Acta, (1978) 536, 88-96.

232 - LABEYRIE, F., BAUDRAS, A. & LEDERER, F. : Flavocytochrome b_2 or L-lactate cytochrome c reductase from yeast.
in "Methods in Enzymology", Fleischer, S. & Packer, L. eds, Academic Press, New York (1978) pp. 238-256.

233 - LEDERER, F. : Sulfite binding to a flavodeshydrogenase, cytochrome b_2 from baker's yeast.
Eur. J. Biochem. (1978) 83, 425-431.

234 - POMPON, D. & LEDERER, F. : Binding of Cibacron blue F3GA to flavocytochrome b_2 From baker's yeast.
Eur. J. Biochem. (1978) 90, 563-569.

235 - PRATS, M. : The association-dissociation state of subunits in the L(+)lactate cytochrome c oxidoreductases (cytochrome b_2) extracted from Saccharomyces cerevisiae and Hansenula anomala yeast.
Biochimie, (1978) 60, 77-79.

236 - VERGNES, O. : Structure du H-flavocytochrome b_2 : separation et propriétés des domaines α et β obtenus par clivage trypsique au locus "a".
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, (1978).

237 - ALLIEL, P.M. : Le bromopyruvate : un marqueur d'affinité et un substrat pour le flavocytochrome b_2.
Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université Paris XI (1979).

238 - BETHGE, P.H. & MATHEWS, F.S. : Rotation-Function study of flavocytochrome b_2.
Acta Cryst. (1979) A35, 412-416.

239 - GERVAIS, M., RISLER, Y., CAPEILLERE-BLANDIN, C., VERGNES, O. & LABEYRIE, F. : Proteolysis as a tool in structural and functional studies of yeast flavocytochrome b_2.
in "Limited Proteolysis in Microorganisms", Cohen, G.N. & Holzer, H. eds, Dept Heath, Education and Welfare pub. NIH 79 1591, US Governmeent printing office, Washington (1979) pp. 227-234.

240 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : Amino acid sequence of the "b_5-like" heme binding domain from chicken sulfite oxidase.
Eur. J. Biochem. (1979) 100, 441-453.

241 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : The "cytochrome b_5 fold" : structure of a novel protein superfamily.
J. Mol. Biol. (1979) 135, 639-650.

242 - KULYS, J., KADZIAUSKIENNE, K., SVIRMITSKAS, G. : Cytochrome b_2 inhibition by mono and dibromopyruvate.

243 - LABEYRIE, F. & BLANDIN, C. : Transfert d'électron dans un système multicytochromique soluble : flavocytochrome b_2 - cytochrome c.
Colloque de Bombannes : "Mécanismes de Reconnaissance à l'Echelle Moléculaire" Le Progrès Scientifique, DGRST (ed) (1979) pp. 142-144.

244 - LABEYRIE, F., GERVAIS, M., TEGONI, M. & RISLER, Y. : Zones hypersensibles aux protéases et structure triglobulaire du flabocytochrome b_2.
Colloques de Bombannes "Mécanismes de Reconnaissance à l'Echelle Moléculaire" Le Progrès Scientifique, DGRST. (ed) (1979) pp. 139-141.

245 - LEDERER, F. : Proteines red-ox bifonctionnelles à plusieurs domaines structuraux
Colloque de Bombannes "Mécanismes de Reconnaissance à l'Echelle Moléculaire" Le Progrès Scientifique, DGRST. (ed) (1979) pp. 154-155.

246 - POMPON, D. & LEDERER, F. : Deazaflavins as cofactors for flavocytochrome b_2 from baker's yeast.
Eur. J. Biochem. (1979) 96, 571-579.

247 - TEGONI, M. : Separation d'une flavoproteine et d'un cytochrome à partir du flavocytochrome b_2 de Saccharomyces cerevisiae.
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1979

248 - ALLIEL, P.M., MULET, C. & LEDERER, F. : Bromopyruvate as an affinity label for baker's yeast flavocytochrome b_2. Stoichiometry of incorporation and localization on the peptide chain.
Eur. J. Biochem. (1980) 105, 343-351.

249 - CAPEILLERE-BLANDIN, C., IWATSUBO, M., TESTYLIER, G. & LABEYRIE, F. : Reactivity with electron acceptors of reduced flavocytochrome b_2 from Hansenula anomala.
in "Flavins and Flavoproteins", K. Yagi, et T. Yamano (eds) Japan Scientific Societies Press, Tokyo, University Park Press Baltimore (1980) pp. 617-630.

250 - CORAZZIN, S. : Action des protéases sur le flavocytochrome b_2 de la levure Hansenula anomala : mise en évidence et localisation des zones sensibles et séparation des deux domaines résistants α_c et β_c.
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1980

251 - GERVAIS, M. & TEGONI, M. : Spontaneous dissociation of a cytochrome core and a biglobular flavoprotein after mild trypsinolysis of the bifunctional Saccharomyces cerevisiae flavocytochrome b_2.
Eur. J. Biochem. (1980) 111, 357-367.

252 - GERVAIS, M., LABEYRIE, F., RISLER, Y. & VERGNES, O. : A flavin mononucleotide binding site in Hansenula anomala nicked flavocytochrome b_2, requiring the association of two domains.
Eur. J. Biochem. (1980) 111, 17-31.

253 - GHRIR, R. : Structure du flavocytochrome b_2 de la levure Saccharomyces cerevisia Caractérisation de quelques produits de protéolyse limitée.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1980).

254 - GHRIR, R. & LEDERER, F. : On a potential hinge region in flavocytochrome b_2 from baker's yeast.
13th FEBS Meeting. Jérusalem (1981) poster n° C1 - P83.

255 - GHRIR, R. & LEDERER, F. : Etude d'une protéine bifonctionnelle par protéolyse spécifique.
dans "2ème Ecole Franco-Africaine de Biologie Moléculaire" Monastir, (Tunisie). Ben Hamida F. editor, I.R.B.M. du C.N.R.S. Paris (1980) p. 252-254.

256 - LEDERER, F. & GUIARD, B. : The protein superfamily of b_5 like cytochromes or how to obtain three dimensional information without recourse to actual X ray.
in "Methodological progress in protein sequence analysis. III International Conference on solid phase methods in protein sequence analysis. Heidelberg (1980).

257 - LEDERER, F. & POMPON, D. : Reactivity of deazaflavins bound to L-lactate dehydrogenase from baker's yeast (flavocytochrome b_2).
in "Flavins and Flavoproteins". Proceedings of the 6th International Symposium, K. Yagi, and T. Yamano, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Univ. Park, Baltimore (1980) p. 609-615.

258 - POMPON, D. : Computer simulation studies of a new kinetic scheme for intramolecular electron transfer.
Eur. J. Biochem. (1980) 106, 151-159.

259 - POMPON, D., IWATSUBO, M. & LEDERER, F. : Flavocytochrome b_2 (baker's yeast). Deuterium isotope effect studied by rapid kinetic methods as a probe for the mechanism of electron transfer.
Eur. J. Biochem. (1980) 104, 479-488.

260 - PRATS, M. : Paramètres influençant les phénomènes d'inactivation-dissociation/réactivation-association induits par des variations de force ionique chez la L(+)lactate : cytochrome c oxydoréductase (cytochrome b_2) extraite de la levure Hansenula anomala.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris (1980) 291, 941-944.

261 - VAN DER KOOI, J.M., GLATZ, P., CASADEL, J. & WOODROW III, G.V. : Cytochrome c interaction with yeast cytochrome b_2. Heme distances determined by energy transfer in fluorescence resonance.
Eur. J. Biochem. (1980) 110, 189-196.

262 - ALBANI, M. : Etude par cinétique rapide d'un transfert d'électrons entre deux cytochromes de la levure Hansenula anomala.
Diplôme d'Etudes Approfondies de Biophysique, Université Paris VI (1981).

263 - CAPEILLERE-BLANDIN, C., BARBER, M.J. & BRAY, R.C. : Differences in electron transfer rates among prosthetic groups between two homologous flavocytochrome b_2 from different yeasts (L-lactate cytochrome c oxidoreductase).
in "Flavins and Flavoproteins" V. Massey & C.H. Williams, Jr. ed. Elsevier North Holland, New York (1981)

264 - GERVAIS, M., THOMAS, M.A., LABEYRIE, F., FAVAUDON, V. & POCHON, F. : Localization of the main association areas between flavocytochrome b_2 and cytochrome c by fluorescence studies.
in "Flavins and Flavoproteins", V. Massey & C.H. Williams,Jr, ed. Elsevier North Holland, New York (1981).

265 - GHRIR, R. & LEDERER, F. : Study of a zone highly sensitive to proteases in flavocytochrome b_2 from Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. (1981) 120, 279-287.

266 - LABEYRIE, F. : Interactions and electron transfer between the flavodehydrogenase and the cytochrome b_2 components of yeast flavocytochrome b_2.
in "Flavins and Flavoproteins", V. Massey, & C.H. Williams, Jr, ed. Elsevier North Holland, New York (1981).

267 - POMPON, D. : Etude de la structure et de la fonction de trois flavoproteins par l'utilisation d'analogues de flavine et par des expériences de cinétiques rapide.
Thèse de Doctorat d'Etat, Univesité Paris-Sud, Centre d'Orsay (1981).

268 - TEGONI, M. : Comparaison de la L-lactate cytochrome c reductase ou flavocytochrome b_2 à l'état soluble et à l'état cristallin.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1981).

269 - URBAN, P. : Etudes cinétique, physicochimique et stoechiométrique d'une réaction reverse catalysée par le flavocytochrome b_2.
Diplôme d'Etudes Approfondies d'Enzymologie, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (1981).

270 - ALLIEL, P.M., GUIARD, B., GHRIR[illegible], R., BECAM, A.M. & LEDERER, F. : Bromopyruvate as an affinity label for baker's yeast flavocytochrome b_2. Identification of a putative active-site cysteine.
Eur. J. Biochem. (1982) 122, 553-558.

271 - GASSER, S.M., OHASHI, A., DAUM, G., BOHNI, P.C., GIBSON, J., REID, G.A., YONETANI, T. & SCHATZ, G. : Imported mitochondrial proteins cytochrome b_2 and cytochrome c_1 are precessed in two steps.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 267-271.

272 - CAPEILLERE-BLANDIN, C. : Transient kinetics of the one electron transfer reaction between reduced flavocytochrome b_2 and oxidized cytochrome c. Evidence for the existence of a protein-complex in the reaction.
Eur. J. Biochm. (1982) in press.

273 - GERVAIS, M., CORAZZIN, S. & RISLER, Y. : How the loss of several residues, at the level of one interglobule junction, modulates the lactate dehydrogenase activity of yeast flavocytochrome b_2 : a study of the nicked enzymes resulting from clostripain and trypsin action.
Biochimie (1982) 64, 509-522.

274 - GERVAIS, M., RISLER, Y. & CORAZZIN, S. : Proteolytic cleavage of Hansenula anomala flavocytochrome b_2 into its two functional domains : isolation of a highly active flavodehydrogenase and a cytochrome b_2 core.
Eur. J. Biochem. (1982) accepté pour publication.

275 - LECLERC C. : Marquages covalents de cytochromes.
Diplôme d'Etudes Approfondies d'Enzymologie, Univ. Paris Sud, Centre d'Orsay (1982).

276 - TEGONI, M., MOZZARELLI, A., ROSSI, G.L. & LABEYRIE, F. : Complex formation and intermolecular electron transfer between flavocytochrome b_2 in the crystal and cytochrome c.
Manuscrit en préparation (1982).

277 - TEGONI, M., SILVESTRINI, M.C., LABEYRIE, F. & BRUNORI, M. : Temperature jump study of the electron transfer reactions in the active center of Hansenula anomala flavocytochrome b_2.
Manuscrit en préparation (1982)

278 - THOMAS, M.A. et al. : Structure quaternaire du Zn-cytochrome c.
Manuscrit en préparation (1982)

279 - THOMAS, M.A. et al. : Localisation des aires d'interaction du H-flavocytochrome b_2 avec le Zn-cytochrome c.
Manuscrit en préparation (1982)

REFERENCES HORS FLAVOCYTOCHROME b_2

280 - SINGER, S.J. : The molecular organization of membranes.
Ann Rev. Biochem. (1974) 43, 805-833.

281 - De PIERRE, J.W. & ERNSTER, L. : Enzyme topology of intracellular membranes.
Ann. Rev. Biochem. (1977) 46, 201-262.

282 - KAGAWA,Y. : Reconstitution of oxidative phosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta (1972) 265, 297-338.

283 - SOMLO, M. : Présence et régulation de la synthèse de la D-LDH chez la levure aérobie.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1966) 48, 247-276.

284 - NYGAARD, A.P. : D-lactic cytochrome c reductase of yeast, a possible intermediate in the Biosynthesis of L-lactic cytochrome c reductase.
Arch. Biochem. Biophys. (1960) 87, 155-

285 - NYGAARD, A.P. : Particulate and soluble D-lactic cytochrome c reductase of yeast.
Acta Chem. Scand. (1960) 14, 1843-1844.

286 - NYGAARD, A.P. : The formation of D and L-lactic cytochrome c reductase during respiratory adaptation in Saccharomyces cerevisiae.
Arch. Biochem. Biophys. (1960) 86, 317-

287 - MAGNUSSON, S. : Thrombin and Prothrombin.
in "The enzymes" P.D. Boyer ed. (1971) Vol. III 3rd edition
Academic Press, New York. London.

288 - GOLDBERG, A.L. & DICE, J.F. : Intracellular protein degradation in mamalian and bacterial cells.
Ann. Rev. Biochem. (1974) 43, 835-869.

289 - GOLDBERG, A.L. & St JOHN, A.C. : Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells : part 2.
Ann. Rev. Biochem. (1976) 45, 747-803.

290 - KEIL, B. : Proteolysis one of the major tools of physiological regulation.
in Proteases and Hormones, MK. Agarwal Editor. Elsevier North Holland Biomedical Press (1979) pp. 1-17.

291 - WOLD, F. : In vivo chemical modification of proteins.
Ann. Rev. Biochem. (1981) 50, 783-814.

292 - REID, K.B.M. & PORTER, R.R. : The proteolytic activation system of complement.
Ann. Rev. Biochem. (1981) 50, 433-464.

293 - KREIL, G. : Transfer of proteins across membranes.
Ann. Rev. Biochem. (1981) 50, 317-348.

294 - RYAN, J.W. : Processing of endogenous polypeptides by the lungs.
Ann. Rev. Physiol. (1982) 44, 241-255.

295 - Proteolytic enzymes (part B)
Methods Enzymol. (1976) 45, 31-638.

296 - Proteolytic enzymes (part C)
Methods Enzymol. (1981) 80, 3-848.

297 - HILL, R.L. : Enzymatic hydrolysis of native proteins.
Advan. Protein. Chem. (1965) 20, 94-99.

298 - STROUD, R.M., KAY, L.M. & DICKERSON, R.E. : The crystal and molecular structure of DiP inhibited bovine trypsin at 2.7 Å resolution.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1972) 36, 125-140.

299 - HARTLEY, B.S. & SHOTTON, D.M. : Pancreatic elastase.
in The Enzymes, ed. Boyer P.D. (Academic Press, New York) (1971)
Vol. 3 pp. 323-373.

300 - ROSSMANN, M.G., ADAMS, M.J., BUEHNER, M., FORD, G.C., HACKERT, M.L., LENTZ, P.J. Jr., Mc PHERSON, A., SCHEVITZ, R.W. & SMILEY, I.E. : Structural constraints of possible mechanisms of lactate dehydrogenase as shown by high resolution studies of the apoenzyme and a variety of enzymes complexes.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1972) 36, 179-191.

301 - MATTHEWS, B.W., JANSONIUS, J.N., COLMAN, P.M., SCHOENBORN, B.P. & DUPOURQUE, D. : Three dimensional structure of thermolysin.
Nature New Biol. (1972) 238, 37-41.

302 - KRAUT, J. : Subtilisin : X ray structure.
in The Enzymes, P.D. Boyer, ed. (Academic Press, New York) (1971)
Vol. 3, pp. 547-560.

303 - ADMAN, E.T. : A comparison of the structures of electron transfer proteins.
Biochim. Biophys. Acta (1979) 549, 107-144.

304 - LILJAS, A., KANNAN, K.K., BERGSTEN, P.C., WAARA, I., FRIDBORG, K., STRANDBERG, B., CARLBOM, U., JARUP, L., LOVGREN,S. & PETEF, M. : Crystal structure of human carbonic anhydrase C.
Nature New Biol. (1972) 235, 131-137.

305 - BLOW, D. : The structure of chymotrypsin.
in The Enzymes" P.D. Boyer, ed. (Academic Press, New York) (1971)
Vol. 3, pp. 185-212.

306 - Nouveau Petit Larousse.
Librairie Larousse, editeur, Paris (1971)

307 - The Merriam-Webster dictionary.
Pocket Bookds eds. New York. (1974).

308 - WETLAUFER, D.B. : Nucleation, rapid folding and globular intrachain regions in proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. Usa. 70 (1973) 697-701.

309 - LEVINTHAL, C. : How to fold graciously.
"Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems". Univ. Illinois at Urbana Champaign, Depts of Chemistry and Physics (1969) p. 22-24.

310 - DRENTH, J., JANSONIUS, J.N., KOEKOEK, R. & WOLTHERS, B.G. : Papaïn X ray structure.
in "The Enzymes" P.D. Boyer, ed. (Academic Press, New York) (1971)
Vol. 3, pp. 485-499.

311 - GUIARD, B. & LEDERER, F. : Amino acid sequence of the "b_5-like" heme binding domain from chicken sulfite oxidase.
Eur. J. Biochem. (1979) 100, 441-453.

312 - STRITTMATTER, P. & OZOLS, J. : The restricted tryptic cleavage of cytochrome b_5
J. Biol. Chem. (1966) 241, 4787-4792.

313 - PLATT,T., FILES, J.G. & WEBER, K. : Lac repressor : specific proteolytic destruction of the NH_2-terminal region and loss of the deoxyribonucleic acid binding activity.
J. Biol. Chem. 248, 110-121.

314 - GOLDBERG, M.E. : Tertiary structure of Escherichia coli β-D galactosidase.
J. Mol. Biol. (1969) 46, 441-446.

315 - NAGLER,L.G. & VARTANYAN, L.S. : Subunit structure of bovine milk xanthine oxidase. Effect of limited cleavage by proteolytic enzymes on activity and structure.
Biochim. Biophys. Acta (1976) 427, 78-90.

316 - BLAKE, C.C.F., EVANS, P.R. & SCOPES, R.K. : Structure of horse-muscle phosphoglycerate kinase at 6 A resolution.
Nature New Biol. (1972) 235, 195-198.

317 - PHILLIPS, D.C. : The hen egg-white lysozyme molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1967) 57, 484-495.

318 - PTITSYN, & FINKELSTEIN, : Similarities of protein topologies : evolutionary divergence, functional convergence or principles of folding.
Quat. Rev. Biophys. (1980) 13, 339-386.

319 - KIRSCHNER, K. & BISSWANGER, H. : Multifunctional proteins.
Ann. Rev. Biochem. (1976) 45, 143-166.

320 - ROSSMANN, M.G. & ARGOS, P. : Protein folding.
Ann. Rev. Biochem. (1981) 50, 497-532.

321 - HILL, R.L., DELANEY, R., FELLOWS, R.E., LEBOVITZ Jr., H.E. : The evolutionary origins of the immunoglobulins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1966) 56, 1762-1769.

322 - CARSIOTIS, M., APPELLA, E., PROVOST, P., GERMERSHAUSEN, J. & SUSKIND, S.R. : Chemical and physical studies of the structure of tryptophan synthetase from Neurospora crassa.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1965) 18, 877-888.

323 - JACKSON, E.N. & YANOFSKY, C. : Localization of two functions of the phosphoribosyl anthranilate transferase of Escherichia coli to distinct regions of the polypeptide chain.
J. Bacteriol. (1974) 117, 502-508.

324 - JANIN, J., TRUFFA-BACHI, P. & COHEN, G.N. : Subunits of the complex protein carrying the threonine-sensitive aspartokinase activity in a mutant of Escherichia coli K12.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1967) 26, 429-434.

325 - VERON, M., FALCOZ-KELLY, F. & COHEN, G.N. : The threonine sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of E.coli K12. The two catalytic activities are carried by two independent regions of the polypeptide chain.
Eur. J. Biochem. (1972) 28, 520-527.

326 - THEZE, J. & SAINT GIRONS, I. : Threonine locus of Escherichia coli K 12 : Genetic structure and evidence for an operon.
J. Bacteriol. (1974) 118, 990-998.

327 - GILBERT, W. : Why genes in pieces ?
Nature, (1978) 271, 501.

328 - BREATHNACH, R. & CHAMBON, R. : Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins.
Ann. Rev. Biochem. (1981) 50, 349- 383.

329 - SLONIMSKI, P.P. : Eléments hypothétiques de l'expression des gènes morcelés : protéines messagères de la membrane nucléaire.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, (1980) Série D 290. 331-334.

330 - JACQ, C., LAZOWSKA, J. & SLONIMSKI, P.P. : Sur un nouveau mécanisme de la régulation de l'expression génétique.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris (1980) Série D. 290, 89-92.

331 - BLAKE, C.C.F. : Exons ende protein functional units.
Nature (1979) 277, 598

332 - BLAKE, C.C.F. : Do genes in pieces imply proteins in pieces ?
Nature (1978) 273, 267

333 - KOURILSKY, P. & CHAMBON, P. : The ovalbumine gene : an amazing gene in eight pieces.
TIBS (1978) 244-247.

334 - YON, J. : Some aspects of protein folding.
Biochimie (1978) 60, 581-591.

335 - RASHIN, A.A. : Location of domains in globular proteins.
Nature (1981) 291, 85-87.

336 - BENYAJATI, C., PLACE, A.R., POWERS, D.A. & SOFFER, W. : Alcohol dehydrogenase gene of Drosophila melanogaster : relationship of intervening sequences to functional domains in the protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78, 2717-2721.

337 - EDELMAN, G.M. : The covalent structure of a human G immunoglobulin. XI. Functional implications.
Biochemistry (1970) 9, 3197-3205.

338 - EDELMAN, G.M. & GALL, W.E. : The antibody problem.
Ann. Rev. Biochem. (1969) 38, 415-466.

339 - PORTER, R.R. : The hydrolysis of rabbit globulin and antibodies with crystalline papain.
Biochem. J. (1959) 73, 119-127.

340 - JOHNSON, J.L. & RAJAGOPALAN, K.V. : Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase. Isolation and characterization of molybdenum and heme domains.
J. Biol. Chem. (1977) 252, 2017-2025.

341 - SOUTHERLAND, W.M., WINGE, D.R. & RAJAGOPALAN, K.V. : The domains of rat liver sulfite oxidase. Proteolytic separation and characterization.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 8747-8752.

342 - ALAKHOV, Y.B., STENGREVICS, O.A., FILIMONOV, V.V. & VENYAMINOV, S.Yu. : Cleavage of elongation factor G into compact domains.
Eur. J. Biochem. (1979) 99, 585-591.

343 - PABO, C.O., SAUER, R.T., STURTEVANT, J.M. & PTASHNE, M. : The λ repressor contains two domains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76, 1608-1612.

344 - SEKIGUCHI, K. & HAKOMORI, S.I. : Functional domain structure of fibronectine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 2661-2665.

345 - WETLAUFER, D.B. & RISTOW, S. : Acquisition of three dimensional structure of proteins.
Ann. Rev. Biochem. (1973) , 135-158.

346 - SCHULZ, G.E.: Structural rules for globular proteins.
Angwe. Chem. Int. Ed. Engl. (1977) 16, 23-32.

347 - KARPLUS, M. & WEAVER, D.L. : Protein-folding dynamics.
Nature (1976) 260, 404-406.

348 - LEVITT, M. & CHOTHIA, C. : Structural patterns in globular proteins.
Nature (1976) 261, 552-558.

349 - BALDWIN, R.L. : Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding.
Ann. Rev. Biochem. (1975) 44, 453-475.

350 - KRISHNAN, K.S. & BRANDTS, J.F. : Scanning calorimetry.
in "Methods in Enzymology"(1978) vol. XLIX p.3.

351 - DESMADRIL, M. & YON, J.M. : Existence of intermediates in the refolding of T_4 lysozyme at pH 7.4
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1981) 101, 563-569.

352 - GHELIS, C., TEMPETE-GAILLOURDET, M. & YON, J. : The folding of pancreatic elastase : independant domain refolding and inter-domain interaction.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1978) 84, 31-36.

353 - CRIPPEN, G.M. : The tree structural organization of proteins.
J. Mol. Biol. (1978) 126, 315-332.

354 - ROSSMAN, M.G. & LILJAS, A. : Recognition of structural domains in globular proteins.
J. Mol. Biol. (1974) 85, 177-181.

355 - MONACO, H.L., CRAWFORD, J.L. & LIPSCOMB, W.M. : Three dimensional structures of aspartate carbamoyl transferase from Escherichia coli and of its complex with cytidine triphosphate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75, 5276-5280.

356 - HASER, R. : Structural approach of the electron transfer pathways in multi-heme cytochromes c_3.
Biochimie (1981) 63, 945-949.

357 - BANKS, R.D., BLAKE, C.C.F., EVANS, P.R., HASER, R., RICE, D.W., HARDY, G.W., MERRETT, M. & PHILLIPS A.W. : Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase : a possible hinge-binding enzyme.
Nature (1979) 279, 773-777.

358 - SCHULZ, G.E., ELZINGA, M., MARX, F. & SCHIRMER, R.H. : Three dimensional structure of adenylkinase.
Nature (1974) 250, 120-123.

359 - PLOEGMAN, J.H., DRENT, G., KALK, K.H., HOL, W.G.J., HEINRIKSON, R.L., KLEIN, P. WENG, L. & RUSSELL, J. : The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese.
Nature (1978) 273, 124-129.

360 - SAWYER, L., SHOTTON, D.M., CAMPBELL, J.W., WENDELL, P.L., MUIRHEAD, H., WATSON, H.C., DIAMMOND, R.R. & LADNER, R.C. : The atomic structure of crystalline porcine pancreatic elastase at 2.5 Å resolution : comparisons with the structure of α chymotrypsin.
J. Mol. Biol. (1978) 118, 137-208.

361 - WODAK, S.J. & JANIN, J. : Analytical approximation to the accessible surface area of proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 1736-1740.

362 - ROSE, G.D. : Hierarchic organization of domains in globular proteins.
J. Mol. Biol. (1979) 134, 447-470.

363 - FERGUSON-MILLER, S., BRAUTIGAN, D.L. & MARGOLIASH, E. : Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochromes c with cytochrome c oxidase.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 149-159.

364 - SPECK, S.H., KOPPENOL, W.H., DETHMERS, J.K., OSHEROFF, N., MARGOLIASH, E., & RAJAGOPALAN, K.V. : Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. Interaction of Horse cytochrome c with beef sulfite oxidase and analysis of steady state kinetics.
J. Biol. Chem. (1981) 256, 7394-7400.

365 - KONIG, B.W., OSHEROFF, N., WILMS, J., MUIJSERS, , DEKKER, H.L. & MARGOLIASH, E. : Mapping of the interaction domain for purified cytochrome c_1 on cytochrome c.
Febs Letters (1980) 111, 395-398.

366 - RAO, S.T. & ROSSMANN, M.G. : Comparison of super-secondary structure in proteins.
J. Mol. Biol. (1973) 76, 241-256.

367 - OHLSSON, I., NORDSTROM, B. & BRANDEN, C.I. : Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases.
J. Mol. Biol. (1974) 89, 339-354.

368 - ROSSMANN, M.G., MORAS, D. & OLSEN, K.W. : Chemical and Biological evolution of a nucleotide binding protein.
Nature (1974) 250, 194-199.

369 - EVENTOFF, W. & ROSSMANN, M.G. : The evolution of dehydrogenases and kinases.
Crit. Rev. Biochem. (1975) 3, 111-140.

370 - ROSSMANN, M.G., LILJAS, A., BRANDEN, C.I. & BANASZAK, L.J. : Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases.
in "The Enzymes", P.D. Boyer, ed. (Academic Press) (1975) pp. 61-102.

371 - KLENOW, H. & HENNINGSEN, I. : Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1970) 65, 168-175.

372 - SETLOW, P. & KORNBERG, A. : Deoxyribonucleic acid polymerase : two distinct enzymes in one polypeptide. II - A proteolytic fragment containing the 5' → 3' exonuclease function. Restoration of intact enzyme functions from the two proteolytic fragments.
J. Biol. Chem. (1972) 247, 232-240.

373 - TANG, J., JAMES, M.N.G., HSU, I.N., JENKINS, J.A. & BLUNDELL, T.L. : Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases.
Nature, (1978) 271, 618-621.

374 - DRENTH, J., JANSONIUS, J.N., KOEKOEK, R. & WOLTHERS, B.G. : The structure or papaïn.
Adv. Prot. Chem. (1971) 25, 79-115.

375 - FLETTERICK, R.J., BATES, D.J., STEITZ, T.A. : The structure of a yeast hexokinase monomer and its complexes with substrates at 2.7 A resolution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1975) 72, 38-42.

376 - PRINGLE, J.R. : Proteolytic artefacts in Biochemistry.
in "Limited Proteolysis in Microorganisms" Cohen, G.N. & Holzer, eds, U.S. Government Printing Office (1979) pp. 191-196.

377 - KEIL, B. : Trypsin.
The Enzymes, P.D. Boyer, ed. Academic Press (1971) Vol. III, p.249-275.

378 - MARKLAND, F.S. & SMITH, E.L. : Subtilisins : primary structure, chemical and physical properties.
in The Enzymes, P.D. Boyer, ed. Academic Press (1971) Vol.III,p.561-608.

379 - HOUMARD, J. & DRAPEAU, G.R. : Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1972) 69, 3506-3509.

380 - DRAPEAU, G.R., BOILY, Y. & HOUMARD, J. : Purification and properties of an extracellular protease of S.aureus
J. Biol. Chem. (1972) 247, 6720-6726.

381 - SAHEKI, T. & HOLZER, H. : Proteolytic activities in yeast.
Biochim. Biophys. Acta (1975) 384, 203-214.

382 - ULANE, R.E. & CALIB, E. : The activating system of chitin synthetase from Saccharomyces cerevisiae. Purification and properties of the activating factor.
J. Biol. Chem. (1976) 251, 3367-3374.

383 - SAHEKI, T. & HOLZER, H. Comparison of the tryptophan synthase inactivating enzymes with proteinases of yeast.
Eur. J. Biochem. (1974) 42, 621-626.

384 - Enzyme nomenclature, recommendations of the nomemclature committee of the I.U.B. Academic Press (1979) p. 314-348.

385 - MATSUBARA, H. : Purification and assay of thermolysin.
Methods in Enzymology (1970) XIX, 642-651.

386 - RYLE, A.P. : The porcine pepsins and pepsinogens.
Methods in Enzymology (1970) XIX, 316-336.

387 - GILLES, A.M., IMHOFF, J.M. & KEIL, B. : α clostripain. Chemical characterization, activity and thiol content of the highly active form of clostripain.
J. Biol. Chem. (1979) 254, 1462-1468.

388 - GOLDBERG, M.E. & ZETINA, C. : Importance of interdomain interactions in the structure, function and stability of the F_1 and F_2 domains isolated from the b_2 subunit of E.coli tryptophan synthetase.
in "Protein Folding" Rainer Jaenicke ed. Elsevier North Holland (1980) p. 469-484.

389 - KOHNO, T. & YOURNO, J. : Proteolytic release of a histidinol dehydrogenase fragment from the double enzyme histidinol dehydrogenase-imidazolylacetol phosphate : L-glutamate amino-transferase.
J. Biol. Chem. (1971) 246, 2203-2206.

390 - KRIMSKY, I. & RACKER, E. : Separation of oxidative from phosphorylative activity by proteolysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
Biochemistry (1963) 2, 512-518.

391 - DAUTRY-VARSAT, A. : Obtention and some properties of an active homoserine dehydrogenase proteolytic fragment of aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II of Escherichia coli K-12.
in Limited Proteolysis in Microorganisms, Cohen G.N. & Holzer, H. eds, US Government Printing office (1979) 213-216.

392 - JOVIN, T.M., ENGLUND, P.T. & BERTSCH, L.L. : Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXVI. Physical and chemical studies of a homogenous deoxyribonucleic acid polymerase.
J. Biol. Chem. (1969) 244, 2996-3008

393 - BRUTLAG, D., ATKINSON, M.R., SETLOW, P. & KORNBERG, A. : An active fragment of DNA polymerase produced by proteolytic cleavage.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1969) 37, 982-989.

394 - KLENOW, H. & OVERGAARD-HANSEN, K. : Proteolytic cleavage of DNA polymerase from E.coli B into an exonuclease unit and a polymerase unit.
Febs Letters (1970) 6, 25-27.

395 - JACOBSEN, H., KLENOW, H. & OVERGAARD-HANSEN, K. : The N-terminal amino acid sequences of DNA polymerase I from E.coli and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis.
Eur. J. Biochem. (1974) 45, 623-627.

396 - KLENOW, H., OVERGAARD-HANSEN, K. & PATKAR, S.A. : Proteolytic cleavage of native DNA-polymerase into two different catalytic fragments. Influcence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase activity accompanying cleavage.
Eur. J. Biochem. (1971) 22, 371-381.

397 - GHISLA, S., MASSEY, V., LHOSTE, J.M. & MAYHEW, S.G. : Fluorescence characteristics of reduced flavins and flavoproteins.
in Reactivity of Flavins, K. Yagi, ed. University of Tokyo Press, (1975) p.15-24.

398 - MASSEY, V. & HEMMERICH, P. : Artificial flavins as active site probes of flavoproteins.
in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Holland Inc (1982) pp. 83-96.

399 - WATENPAUGH, K.D., SIEKER, L.C., JENSEN, L.H., LE GALL, J. & DUBOURDIEU, M. : Structure of the oxidized form of a flavodoxin at 2.5 Å resolution : resolution of the phase ambiguity by anomalous scattering.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1972) 69, 3185-3188.

400 - WATENPAUGH, K.D., SIEKER, L.C. & JENSEN, L.H. : The bindigg of riboflavin 5'phosphate in a flavoprotein : flavodoxin at 2 Å resolution.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1973) 70, 3857-3860.

401 - BURNETT, R.M., DARLING, G.D., KENDALL, D.S., LEQUESNE, M.E., MAYHEW, S.G., SMITH, W. & LUDWIG, M.L. : The structure of the oxidized form of clostridial flavodoxin at 1.9 Å resolution. Description of the flavin mononucleotide binding site.
J. Biol. Chem. (1974) 249, 4383-4392.

402 - SCHULTZ, G.E., SCHIRMER, R.H., SACHSENHEIMER, W. & PAI, E.F. : The structure of the flavoenzyme glytathione reductase.
Nature (1978) 273, 120-124.

403 - WIERENGA, R.K., DEJONG, R.J., KALK, K.H., HOL, W. & DRENTH, J. : Crystal structure of p.hydroxybenzoate hydroxylase.
J. Mol. Biol. (1979) 131, 55-73.

404 - KARPLUS, P.A. & HERRIOTT, J.R. : The structure of ferredoxin-NADP oxidoreductase : a progress report.
in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Hollan (1982) pp. 28-31.

405 - APTE, B.N. & ZIPSER, D. : In vivo splicing of protein : one continuous polypeptide from two independently functioning operons.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1973) 70, 2969-2973.

406 - HENDRIX, R.W. & CASJENS, S.R. : Protein fusion in bacteriophage λ head assembly.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71, 1451-1455.

407 - FRUTON, J.S. : Proteinase-catalysed synthesis of peptide bonds.
Adv. Enzymol. (1982) 53, 239-306.

408 - Mc LACHLAN : Repeating sequences and gene duplication in proteins.
J. Mol. Biol. (1972) 64, 417-437.

409 - EDELMAN, G.M. : The covalent structure of a human γG immunoglobulin XI. Functional implications.
Biochemistry (1970) 9, 3197-3205.

410 - CUNNINGHAM, B.A., GOTTLIEB, P.D., PFLUMM, M.N. & EDELMAN, G.M. : Immunoglobulin structure : diversity, gene duplication, and domains.
Progress in Immunology (1971) 3-24

411 - BROWN, J.R. : Structure of bovine serum albumin.
Fed. Proc. (1975) 34, 2105.

412 - BEHRENS, P.Q., SPIEKERMAN, A.M. & BROWN, J.R. : Structure of human serum albumin.
Fed. Proc. (1975) 34, 2106.

413 - HOOD, J.M., FOWLER, A.V. & ZABIN, I. : On the evolution of β galactosidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75, 113-116.

414 - MIOZZARI, G.F. & YANOFSKY, C. : Gene fusion during the evolution of the tryptophan operon in Enterobacteriaceae.
Nature (1979) 277, 486-489.

415 - LI, S.L., HANLON, J. & YANOFSKY, C. : Structural homology of the glutamine amidotransferase subunits of the anthranilate synthetases of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and Serratia marcescens.
Nature (1974) 248, 48-50.

416 - GRIESHABER, M. & BAUERLE, R. : Structure and evolution of a bifunctional enzyme of the tryptophan operon.
Nature New Biol. (1972) 236, 232-235.

417 - YOURNO, J., KOHNO, R. & ROTH, J.R. : Enzyme evolution : generation of a bifunctional enzyme by fusion of adjacent genes.
Nature (1970) 228, 820-824.

418 - MULLER-HILL, B. & KANIA, J. : Lac repressor can be fused to β galactosidase.
Nature (1974) 249, 561-563.

419 - SILHAVY, T.J., CASADABAN, M.J., SHUMAN, H.A. & BECKWITH, R. : Conversion of β galactosidase to a membrane-bound state by gene fusion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 73, 3423-3427.

420 - RECHLER, M.M. & BRUNI, C.B. : Properties of a fused protein formed by genetic manipulation.
J. Biol. Chem. (1971) 246, 1806-1813.

421 - LEVINE, M., MUIRHEAD, H., STAMMERS, D.K. & STUART, D.I. : Structure of pyruvate kinase and similarities with other enzymes : possible implications for protein taxonomy and evolution.
Nature (1978) 271, 626-630.

422 - FELDHOFF, R.C., REED, R.G. & PETERS, T. : Structural features and ligand-binding properties of two halves of bovine albumin.
Fed. Proc. (1975) 34, 2107-

423 - SPATZ, L. & STRITTMATTER, P. : A form of cytochrome b_5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues.
Proc. Natl. Acad. Sc. USA (1971) 68, 1042-1046.

424 - ITO, A. : Hepatic sulfite oxidase identified as cytochrome b_5 like pigment extractable from mitochondria by hypotonic treatment.
J. Biochem. (1971) 70, 1061-1064.

425 - D'ANNA, Jr. J.A. & TOLLIN, G. : Studies of flavin-protein interaction in flavoproteins using protein fluorescence and circular dichroïsm. Biochemistry (1972) 11, 1075-1080.

426 - LUDWIG, M., PATTRIDGE, K.A., SMITH, W.W., JENSEN, L.H. & WATENPAUGH, K.D. : Comparisons of flavodoxin structures. in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds Elsevier North Holland Inc (1982) p. 19-27.

427 - PAI, E.F. & SCHULZ, G.E. : Structure and catalytic cycle of the flavoenzyme glutathione reductase. in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Holland Inc. (1982) p. 3-10.

428 - WIERENGA, R.K., KALK, K.H., Van Der LAAN, J.M., HOFSTEENGE, J., WEIJER, W.J., JEKEL, P.A., BEINTEMA, J.J., MULLER, F. & Van BERKEL, W.J.H. : The structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase. in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Holland Inc. (1982) p.11-18.

429 - LINDQUIST, Y. & BRANDEN, C.I. : Structural studies on glycolate oxidase from spinach. in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Holland Inc. (1982) p. 32-35.

430 - STALLINGS, W.C., PATTRIDGE, K.A., LUDWIG, M.L., MASSEY, V. & CHOONG, Y.S. : Preliminary X-ray diffraction studies of crystals of lactate oxidase from Mycobacterium Smegmatis. in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Holland Inc. (1982) p. 36-37.

431 - STRITTMATTER, P., BARRY, R.E. & CORCORAN, D. : Tryptic conversion of cytochrome b_5 reductase to an active derivative containing two peptide chains. J. Biol. Chem. (1972) 247, 2768-2775.

432 - TANAKA, M., HANIU, M. & YASUNOBU, K.T., MAYHEW, S.G. : The amino acid sequence of the Clostridium MP flavodoxin. J. Biol. Chem. (1974) 14, 4393-4396.

433 - JAMES, G.T. : Peptide mapping of proteins. Methods in Biochemical Analysis (1980) 26, 165-200.

434 - BRIMACOMBE, R., STOFFLER, G., WITTMANN, H.G. : Ribosome structure. Ann. Rev. Biochem. (1978) 47, 217-249.

435 - BRIGGS, M.M. & CAPALDI, R.A. : Near Neighbor relationships of the subunits of cytochrome c oxidase. Biochemistry (1977) 16, 73-77.

436 - AZZI, A. : Cytochrome c oxidase : towards a clarification of its structure, interactions and mechanism. Biochim. Biophys. Acta (1980) 594, 231-252.

437 - MILLETT, F., DARLEY-USMAR, V. & CAPALDI, R.A. : Cytochrome c is cross linked to subunit II of cytochrome c oxidase by a water soluble carbodiimide. Biochemistry (1982) 21, 3857-3862.

438 - BRIGGS, M. & CAPALDI, R.A. : Cross linking studies on a cytochrome c-cytochrome c oxidase complex. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1978) 80, 553-559.

439 - KANG, C.H., BRAUTIGAN, D.L., OSHEROFF, N. & MARGOLIASH, E. : Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. Réaction of carboxydinitrophenyl-and trinitrophenyl-cytochromes c with baker's yeast cytochrome c peroxidase.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 6502-6510.

440 - WADA, K. & OKUNUKI, K. : Studies on chemically modified cytochrome c. II - The trinitrophehylated cytochrome c.
J. Biochem. (Tokyo) (1969) 66, 249-262.

441 - STAUDENMAYER, N., NG, S., SMITH, M.B., & MILLETT, F. : Effect of specific trifluoroacetylation of individual cytochrome c lysines on the reaction with cytochrome c oxidase.
Biochemistry (1977) 16, 600-604.

442 - SMITH, H.T., STAUDENMAYER, N. & MILLETT, F. : Use of specific lysine modifications to locate the reaction site of cytochrome c with cytochrome oxidase.
Biochemistry (1977) 16, 4971-4974.

443 - MILLETT, F., SMITH, H., NG. S., SMITH, M., AHMED, A. & STAUDENMAYER, N. : The reaction between cytochrome b_5 and cytochrome c derivatives modified at single lysine residues.
Fed. Proc. (1977) 36, 815 - Abst. 2865.

444 - BISSON, R. & CAPALDI, A. : Binding of arylazidocytochrome c to yeast cytochrome c peroxidase.
J. Biol. Chem. (1981) 256, 4362-4367.

445 - BISSON, R., JACOBS, B. & CAPALDI, R.A. : Binding of arylazidocytochrome c derivatives to beef heart cytochrome c oxidase cross-linking in the high and low affinity binding sites.
Biochemistry (1980) 19, 4173-4178.

446 - BISSON, R., AZZI, A., GUTWENIGER, H., COLONNA, R., MONTICUCCO, C. & AZROTTI, A. : Interaction of cytochrome c with cytochrome c oxidase. Photo affinity labeling of beef heart cytochrome c oxidase with arylazido cytochrome c.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 1874-1880.

447 - MORELAND, R.B. & DOCKTER, M.E. : Interaction of the "back" of yeast iso-1-cytochrome c with yeast cytochrome c oxidase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1981) 99, 339-346.

448 - VANDERKOOI, J.M. & ERECINSKA, M. : Cytochrome c interaction with membranes : Absorption and emission spectra and binding characteristics of iron free cytochrome c.
Eur. J. Biochem. (1975) 60, 199-207.

449 - VANDERKOOI, J.M., ADAR,F. & ERECINSKA, M. : Metallocytochromes c : characterization of electronic absorption and emission spectra of Sn^{4+} and Zn^{2+} cytochrome c.
Eur. J. Biochem. (1976) 64, 381-387.

450 - VANDERKOOI, J.M., LANDESBERG, R., HAYDEN, G.M. & OWEN, C.S. : Metal free and metal substituted cytochromes c. Use in characterization of the cytochrome c binding site.
Eur. J. Biochem. (1977) 81, 339-347.

451 - SALEMME, F.R. : An hypothetical structure for an intermolecular electron transfer complex of cytochromes c and b_5.
J. Mol. Biol. (1976) 102, 563-568.

452 - MARGOLIASH, E. & LUSTGARTEN, J. : Interconversion of horse heart cytochrome c monomer and polymers.
J. Biol. Chem. (1962) 237, 3397-3405.

453 - PARR, G.R., HANTGAN, R.R. & TANIUCHI, H. : Formation of two alternative complementing structures from a cytochrome c heme fragment (residue 1 to 38) and the apoprotein.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 5381-5388.

454 - SEITER, C.H.A., MARGALIT, R. & PERRAULT, R. : The cytochrome c binding site on cytochrome c oxidase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1979) 86, 473-477.

455 - FULLER, S.D., DARLEY-USMAR, V.M. & CAPALDI, R.A. : Covalent complex between yeast cytochrome c beef heart cytochrome c oxidase which is active in electron transfer.
Biochemistry (1981) 20, 7046-7053.

456 - BIRCHMEIER, W., KOHLER, C.E. & SCHATZ, G. : Interaction of integral and peripheral membrane proteins : affinity labeling of yeast cytochrome oxidase by modified yeast cytochrome c.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 73, 4334-4338.

457 - REIDER, R. & BOSSHARD, H.R. : The cytochrome c oxidase binding site on cytochrome c. Differential chemical modification of lysine residues in free and oxidase bound cytochrome c.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 6045-6053.

458 - REIDER, R. & BOSSHARD, H.R. : Comparison of binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc_1 and cytochrome c_1 : differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c.
J. Biol. Chem. (1980) 255, 4732-4739.

459 - SIMONDSEN, R.P. & TOLLIN, G. : Transient kinetics of electron transfer reactions of flavodoxin : ionic strength dependence of semiquinone oxidation by cytochrome c, ferricyanide and ferric EDTA.
in Flavins and Flavoproteins, V. Massey & C.H. Williams, eds, Elsevier North Holland Inc. (1982) p. 719-724.

460 - MANDEL, N., MANDEL, G., TRUS, B.L., ROSENBERG, J., CARLSON, G. & DICKERSON,R.E.: Tuna cytochrome c at 2.0 Å resolution III coordinate optimization and comparison of structure.
J. Biol. Chem. (1977) 252, 4619-4636.

461 - CAPALDI, R.A., DARLEY-USMAR, V., FULLER, S. & MILLETT, F. : Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase.
FEBS Letters. (1982) 138, 1-7.

462 - SPECK, S.H., FERGUSON-MILLER, S., OSHEROFF, N. & MARGOLIASH, E. : Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification : kinetics of reaction with been mitochondrial reductase and functional organization of the respiratory chain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76, 155-159.

463 - SMITH, H.T., AHMED, A.J. & MILLETT, F. : Electrostatic interaction of cytochrome c with cytochrome c_1 and cytochrome oxidase.
J. Biol. Chem. (1981) 256, 4984-4990.

464 - MALMSTROM, B.G. : Cytochrome c oxidase structure and catalytic activity.
Biochim. Biophys. Acta (1979) 549, 281-303.

465 - KANG, C.H., FERGUSON-MILLER,S. & MARGOLIASH, E. : Steady state kinetics binding of eukaryotic cytochromes c with yeast cytochrome c peroxydase.
J. Biol. Chem. (1977) 252, 919-926.

466 - SMITH, M.B. & MILLETT, F.S. : A ^{19}F nuclear magnetic resonance study of the interaction between cytochrome c and cytochrome c peroxidase.
Biochim. Biophys. Acta (1980) 626, 64-72.

467 - MAUK, M.R., REID, L.S. & MAUK, A.G. : Spectrophotometric analysis of the interaction between cytochrome b_5 and cytochrome c.
Biochemistry (1982) 21, 1843-1846.

468 - NG, S., SMITH,M.B., SMITH, H.T. & MILLETT, F. : Effect of modification of individual cytochrome c lysines on the reaction with cytochrome b_5.
Biochemistry (1977) 16, 4975-4978.

469 - STONEHUERNER, J., WILLIAMS, J.B. & MILLETT, F. : Interaction between cytochrome c and cytochrome b_5.
Biochemistry (1979) 18, 5422-5427.

470 - OSHINO, N. & CHANCE, B. : The properties of sulfite oxidation in perfused rat liver ; interaction of sulfite oxidase with the mitochondrial respiratory chain.
Arch. Biochem. Biophys. (1975) 170, 514-528.

471 - WEBB,M., STONEHUERNER, J. & MILLETT, F. : The use of specific lysine modifications to locate the reaction site of cytochrome c with sulfite oxidase.
Biochim. Biophys. Acta (1980) 593, 290-298.

472 - CHURCHILL, P.F., DE ALVARE, L.R. & KIMURA, T. : Topological studies of the steroid hydroxylase complexes in bovine adrenocortical mitochondria.
J. Biol. Chem. (1978) 253, 4924-4929.

473 - GEREN, L.M. & MILLETT, F. : Interaction between adrenodoxin and cytochrome c.
J. Biol. Chem. (1981) 256, 4851-4855.

474 - BECAM, A.M. & LEDERER, F. : Amino acid sequence of the cytochrome c from the yeast Hansenula anomala. Identification of three methylated positions.
Eur. J. Biochem. (1981) 118, 295-302.

475 - POULOS, T.L. & KRAUT, J. : A hypothetical model of the cytochrome c peroxidase cytochrome c electron transfer complex.
J. Biol. Chem. (1980) 255, 10322-10330.

476 - BROGER, C., NALECZ. M.J. & AZZI, A. : Interaction of cytochrome c with cytochrome bc_1 complex of the mitochondrial respiratory chain.
Biochim. Biophys. Acta (1980) 592, 519-527.

477 - MAYHEW, S.G. & LUDWIG, M. : Flavoproteins and electron transferrring flavoproteins .
in "The Enzymes" P.D. Boyer, ed., Vol. XII part B, 3rd edition
p. 57-118.

478 - KOPPENOL, W.H. & MARGOLIASH, E. : The asymmetric distribution of charges on the surface of horse cytochrome c.
J. Biol. Chem. (1982) 257, 4426-4437?